



ISSN 1310-8131 (Print) ISSN 2683-0787 (Online)

Ендокринология

Endocrinologia

Юбилеен брой *Anniversary issue*

- Свойства и функция на йодтиронин дейодиназите въз основа на изследвания върху генетични дефекти при мишки и хора
Properties and Function of Iodothyronine Deiodinases Based on Studies of Genetic Defects in Mice and Humans
- „Заг маската“ на тиреотоксикозата – две фамилии със синдром на Рефетов
„Behind the Mask“ of Thyrotoxicosis – Two Families with Refetoff Syndrome
- Уринна йодна концентрация при бременни жени от различни региони на България
Urine Iodine Concentration in Pregnant Women from Different Regions of Bulgaria
- Промени в обема и структурата на щитовидната жлеза, тиреоиден аутоимунитет при бременни жени – български данни от 2019 година
Changes in the Volume and Structure of the Thyroid Gland, Thyroid Autoimmunity in Pregnant Women – Bulgarian data from 2019
- Ефект на хипотиреозидизма върху атерогенните липопротеини, инсулиновата резистентност и адипонектина при пациенти с нормално и наднормено тегло
Effect of Hypothyroidism on Atherogenic Lipoproteins, Insulin Resistance and Adiponectin in Normal and Overweight Patients
- Приложение на хормоните на щитовидната жлеза при хипотиреозидни и еутиреозидни пациенти: анкетно проучване THESIS* сред български лекари
Use of Thyroid Hormones in Hypothyroid and Euthyroid Patients: a THESIS Questionnaire Survey of Bulgarian Physicians*

Българско дружество по ендокринология

4/2020

Bulgarian Society of Endocrinology



ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

Списанието се индексира 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

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 Христозов/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. Фьовени (Будапеща)

A. Isidori (Rome)/А. Изидори (Рим)

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

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

- Франка, Моника М., Думитреску, Александра М., Рефетов, Самуил
Свойства и функция на йодтиронин дейодиназите въз основа на изследвания върху генетични дефекти при мишки и хора 211

Оригинални статии

- Христов, Кирил Х., Хосамелдин, Мажед, Иванова, Ива В., Димитрова, Радина С., Сидерова, Мира В., Бояджиева, Мила Б., Рефетов, Самуил
„Зад маската“ на тиреотоксикозата – две фамилии със синдром на Рефетов 227
- Борисова, Анна-Мария И., Иванова, Людмила Б., Трифонова, Бояна Ц., Даковска Лилия Н., Михайлова, Евгения Н., Вуков, Мирчо И. Уринна йодна концентрация при бременни жени от различни региони на България 244
- Борисова, Анна-Мария И., Иванова, Людмила Б., Трифонова, Бояна Ц., Даковска Лилия Н., Михайлова, Евгения Н., Вуков, Мирчо И. Промени в обема и структурата на щитовидната жлеза, тиреоиден аутоимунитет при бременни жени – български данни от 2019 година 256
- Лозанов, Лъчезар Б., Колева, Веселина С., Лозанов, Боян С., Аргирова, Радка М., Горчева, Десислава И., Костова, Бойка К., Борисов, Радослав П., Вуков, Мирчо И. Ефект на хипотиреоидизма върху атерогенните липопротеини, инсулиновата резистентност и адипонектина при пациенти с нормално и наднормено тегло 277
- Борисова, Анна-Мария И., Боянов, Михаил А., Атанасио, Роберто, Хегедуш, Ласло, Нагу, Ендре, Негро, Роберто, Папини, Енрико, Перос, Петрос Приложение на хормоните на щитовидната жлеза при хипотиреоидни и еутиреоидни пациенти: анкетно проучване THESIS* сред български лекари 289

Journal Endocrinologia volume XXV, number 4/2020

Contents**Reviews**

- França, Monica M., Dumitrescu, Alexandra M., Refetoff, Samuel
Properties and Function of Iodothyronine Deiodinases Based on Studies of Genetic Defects in Mice and Humans 219

Original articles

- Hristozov, Kiril H., Hossameldin, Maged, Ivanova, Iva V., Dimitrova, Radina S., Siderova, Mira V., Boyadzieva, Milla B., Refetoff, Samuel „Behind the Mask“ of Thyrotoxicosis – Two Families with Refetoff Syndrome 236
- Borissova, Anna-Maria I., Ivanova, Lyudmila B., Trifonova, Boyana T., Dakovska, Lilia N., Mihailova, Eugenia N., Vukov, Mircho I. Urine Iodine Concentration in Pregnant Women from Different Regions of Bulgaria 250
- Borissova, Anna-Maria I., Trifonova, Boyana C., Dakovska, Lilia N., Mihailova, Eugenia N., Vukov, Mircho I. Changes in the Volume and Structure of the Thyroid Gland, Thyroid Autoimmunity in Pregnant Women – Bulgarian data from 2019 266
- Lozanov, Lachezar B., Koleva, Veselina S., Lozanov, Bojan S., Argirova, Radka M., Gorcheva, Desislava I., Kostova, Boyka K., Borissova, Radoslav P., Vukov, Mircho I. Effect of Hypothyroidism on Atherogenic Lipoproteins, Insulin Resistance and Adiponectin in Normal and Overweight Patients 283
- Borissova, Anna-Maria I., Boyanov, Mihail A., Attanasio, Roberto, Hegedüs, Laszlo, Nagy, Endre, Negro, Roberto, Papini, Enrico, Perros, Petros Use of Thyroid Hormones in Hypothyroid and Euthyroid Patients: a THESIS* Questionnaire Survey of Bulgarian Physicians 299

25 години списание *Ендокринология*

Уважаеми колеги,

Списание „Ендокринология“ навърши четвърт столетие. За 25 години бяха издадени 100 броя, средно по 60 страници всеки или над 6 000 страници, съдържащи оригинални научни статии и обзори по актуални проблеми на ендокринологията във всичките ѝ раздели. Те отразяват постиженията на българската наука за същия период, което има не само информативен характер, но представлява стимул за последващи научни проучвания. Повечето от тях имат практическо приложение и са основа за приемането на препоръки и алгоритми за съвременна диагностика, лечение и профилактика на най-честите ендокринни заболявания, каквито са захарният диабет, затлъстяването, йод-дефицитните и аутоимунните тиреоидни заболявания. Публикациите имат важен принос за израстване и атестиране на академичните кадри в медицинските университети у нас, както и за популяризиране на българската ендокринология в международен план.

Началните години на изданието бяха свързани с редица трудности и липса на достатъчно възможности. Те бяха преодоляни с натрупания във времето опит, включително с изграждане на партньорско сътрудничество с представените у нас фармацевтични компании за популяризиране на съвременни средства за лечение и контрол на ендокринните заболявания. На два пъти сп. „Ендокринология“ бе номинирано от Министерството на науката и образованието на първо място сред другите медицински издания у нас. То получи признание и в международен план чрез индексирането му в редица авторитетни международни реферативни агенции.

Позволете ми като дългогодишен главен редактор на сп. „Ендокринология“ през първите 18 години от излизане на първия му брой, да благодаря на всички, които допринесоха за утвърждаването му като едно от водещите научни издания по медицина у нас. Пожелавам на главния редактор и на настоящата редакционна колегия да продължат успешното развитие на списанието в полза на българските лекари-ендокринологи.

24. 10. 2020 г.

Проф. д-р Боян Лозанов,
Почетен Главен редактор

25 years *Journal Endocrinologia*

The Journal ENDOCRINOLOGIA is now a quarter of a century old. Over the course of the last 25 years 100 editions have been issued with an average of 60 pages each or well over 6,000 pages in total covering original research articles and reviews on topical problems of endocrinology covering all of its aspects. They have reflected the achievements of Bulgarian science during the same period, being not only informative as such, but serving as motivators for further scientific quests. The majority of the papers are of practical application and make a basis for accepting recommendations and algorithms for modern diagnostics, treatment and prevention of the most frequent endocrine diseases such as diabetes, obesity, iodine deficiency and autoimmune thyroid diseases. The publications have made a significant contribution to further educating and certifying academic staff in our Medical Universities as well as to drawing attention to Bulgarian endocrinology abroad.

In the early years the publication had to cope with a number of difficulties and a lack of sufficient capacities. Those have been overcome thanks to the accumulating experience, including relations of partnership with the pharmaceutical companies based in this country, in order to disseminate up-to-date means of treatment and control of endocrine diseases. ENDOCRINOLOGIA has twice been nominated by the Bulgarian Ministry of Science and Education as the number one medical journal in this country. It has also been recognized on an international scale through its indexation in a number of authoritative foreign referent agencies.

In my capacity as a long-standing Editor-in-Chief of ENDOCRINOLOGIA over the first 18 years since its first issue, please allow me to thank everybody who has contributed to its establishment as one of the leading scientific publications in Bulgaria's medical circles. I also wish the present Editorial Board and Editor-in-Chief success in continuing with the successful development of the Journal for the continued development of Bulgarian doctors of endocrinology.

24. 10. 2020

Prof. Bojan Lozanov, MD, PhD
Honorary Editor-in-Chief

Скъпи колеги и читатели,

Вече 25 години списание „Ендокринология“ – авторитетният печатен орган на БДЕ заема достойно място в българската медицинска периодика благодарение на високото научно ниво, актуалност и значимост на публикуваните материали.

Настоящия юбилеен брой – идеен замисъл на проф. Лозанов, посвещаваме на неговия творчески път и развитието на българската тиреоидология.

Проф. д-р Мария Орбецова, главен редактор

Dear colleagues and dear readers,

During the past 25 years the journal „Endocrinologia“, which is the authoritative publication of the Bulgarian Society of Endocrinology, has earned its worthy place amongst Bulgarian Medical periodicals. This has been achieved due to the scientific excellence, relevance and importance of its published materials.

This Jubilee issue, originally conceived by Prof Lozanov, is dedicated to his creative work in the development of Bulgarian thyroidology.

Prof. Maria Orbetzova, Editor-in-Chief

Отиде си Проф. Боян Лозанов. Наш учител, лекар, човек и учен.

Учителят Боян Лозанов ни посочи пътя в медицината. Той ни помогна да открием мястото, логиката, красотата и очарованието на ендокринологията и да си изградим отношение към тази малка, но толкова важна щитовидна жлеза. Професор Лозанов даде здравата основа на няколко поколения български ендокринолози, работили под негово ръководство в Клиниката по тиреоидни и метаболитни костни заболявания на УСБАЛЕ, по-известна като „Тиреоидна клиника“.

Лекарят Боян Лозанов ни научи на отношение към болния човек в неговото физическо и душевно единство. Водещо в клиничната му работа беше взаимното уважение между лекар и пациент. Той не допусна навлизащото в последните десетилетия технократско отношение към медицината да наруши правилата на класическата българска пропедевтична школа, от които се водеше – „който добре разпитва и преглежда, поставя правилна диагноза“. Всички помним академичните визитации в Клиниката, на които понякога се преговаряше цялата вътрешна медицина.

Човекът Боян Лозанов ни показа как да запазим себе си в трудното поприще на медицината, да останем в Клиниката и извън нея хора, колеги и приятели. Подкрепяше, хвалеше, анализираше, критикуваше, гълчеше като глава на едно голямо семейство. Поздравяваше с усмивка и не губеше чувството си за хумор и в най-бурни времена. Аристократ по дух и възпитание, човек с широки интереси, той успяваше да се издигне над дребнодушието на съвременното общество и да запази вкуса си към малките радости на живота.

Ученият Боян Лозанов укрепил основите на българската школа в тиреоидологията и поставил началото на комуникацията с Европейската Тиреоидна Асоциация. Огромен е приносът му в борбата с йод-дефицитните състояния, чийто успех достигна своя връх със сертифицирането на България от ICCIDD към UNESCO през 2008 г. като страна с ликвидиран йоден дефицит. С много дух и ентузиазъм организира Първия международен курс по тиреоидология за лекари от Централна и Източна Европа, състоял се под егидата и с участието на водещи учени от Европейската Тиреоидна Асоциация.

Обаятелен и завладяващ, интересен и академичен лектор, професор Лозанов увличаше аудиторията и трайно разпали интереса ни към заболяванията на щитовидната жлеза. С вкус към новите идеи, не спираше да работи за тях и да подтиква по-младите колеги към научна дейност. Отнасяше се с уважение към делото на неговите предшественици и ни даваше пример за приемственост в професионалното развитие.

Приемаме завета на професор Лозанов, наш учител, наставник, колега, приятел, допринесъл много за това, което сме, за да продължим да вървим в същата посока.

От екипа на Клиниката по тиреоидни и метаболитни костни заболявания
на УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“

„Кое е със здрава основа,
не може да бъде изкоренено.
Кое е сграбчено здраво,
не може да се изплъзне.
Ще го почита поколение след поколение.“
Лао Дзъ „Дао гъ Дзин“

Свойства и функция на йодтиронин дейодиназите въз основа на изследвания върху генетични дефекти при мишки и хора

Франка, Моника М.¹, Думитреску, Александра М.^{1,3}, Рефетов, Самуил^{1,2,4}

Категора по Медицина¹ и Педиатрия²,

Комитет по Молекулярен метаболизъм и хранене³,

Комитет по Генетика⁴, Чикагски университет, Чикаго, САЩ

Постъпване: 18. 10. 2020

Приемане: 26. 10. 2020

Резюме

Откриването на трийодтиронин (T_3) и на неговото свързване със специфични рецептори подпомогна разбирането на начина на действие на тиреоидните хормони. Също така, образуването на T_3 от неговия прекурсор T_4 , секретирани от щитовидната жлеза, поясни как необходимото количество активен хормон достига до органите и клетките по специфичен начин и в съответствие с променящите се изисквания. Това се постига чрез действието на специфични йодтиронин дейодинази.

Настоящият миниобзор представя свойствата и функцията на йодтиронин дейодиназите и контрола им върху доставката на T_3 към прицелните тъкани, използвайки като модел естествено срещани се генетични грешки при хора и мишки, както и лабораторно индуцирани мутации при мишки.

Ключови думи:

йодтиронин дейодинази, мутации, хора, мишки

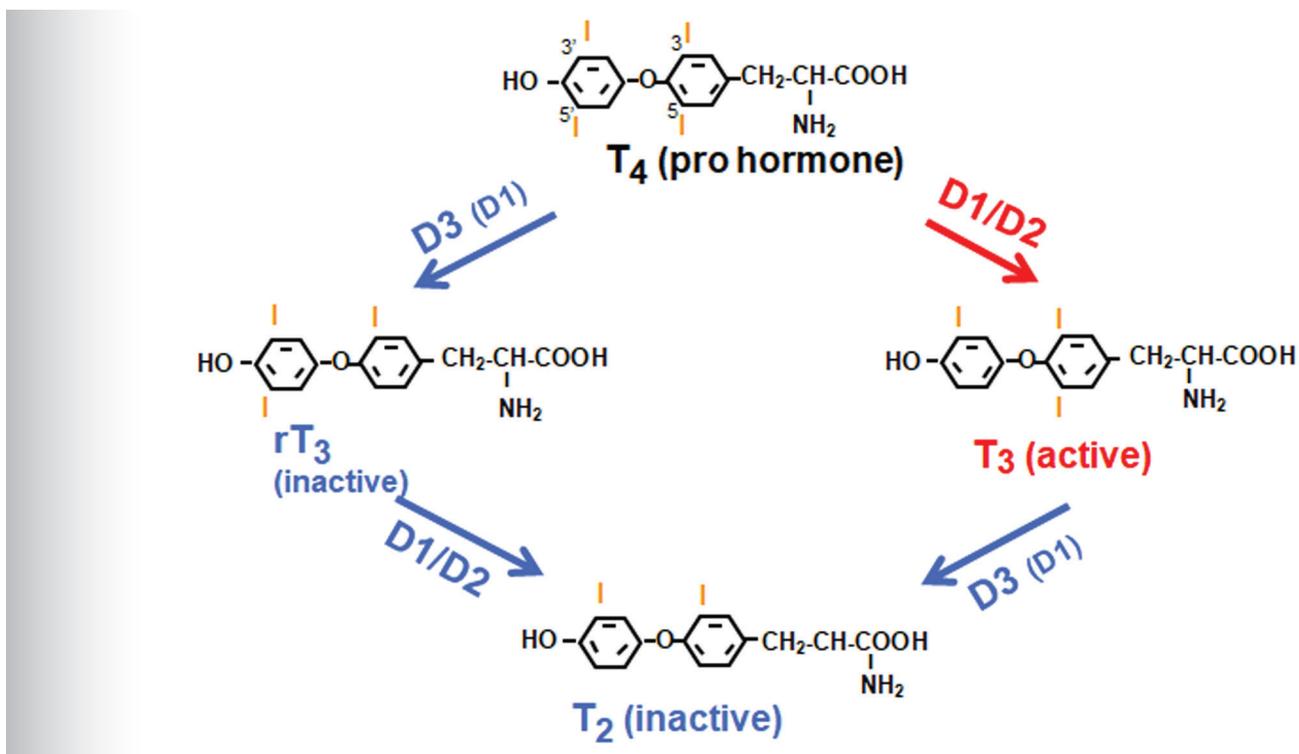
Въведение

Тиреоидните хормони (ТХ) преминават през клетъчните мембрани чрез специфични транспортери, принадлежащи към семействата МСТ (транспортери на монокарбоксилни киселини), ОАТР (транспортерни полипептиди на органичен анион) и LAT (транспортери на L-тип аминокиселини). Монокарбоксилатният транспортер 8 (МСТ8) е високоефективен и специфичен за щитовидните хормони 3,3',5,5'-тетрайодтиронин (тироксин или T_4) и 3,3',5-трийодтиронин (T_3) (1). T_4 е прекурсор, който може да бъде активиран или инактивиран от група селеноцистеин (Sec)-съдържащи ензими. Тези селеноензими имат свойства да отстраняват йодните атоми от специфична позиция върху йодтирониновите молекули и, следователно, са наречени дейодинази.

Процесът на дейодиниране катализира първата стъпка от действието на ТХ чрез регулиране наличността на метаболитно активния T_3 (1). Това се постига чрез отстраняване на 5'-йод от външния пръстен на T_4 . Реакцията се катализира от йодтиронин дейодиназите тип I (D1) и тип II (D2). Дейодинирането на вътрешния пръстен (йод-5) се катализира главно от дейодиназа III (D3), продуцирайки 5',3,3'-трийодтиронин (обратен T_3 или rT_3), и в по-малка степен също от D1 (Фиг. 1).

ТХ контролират положително експресията на D1 и D3 и отрицателно експресията на D2. D1 изглежда има важен ефект при хипертиреоидни състояния и контролира циркулиращия серумен T_3 , докато D2 е свързана с хипотиреоидни състояния и контролира вътреклетъчния T_3 (2).

Фигура 1. Пътица на йодтиронин дейодиниране.



Основният продукт от секрецията на тиреоидни хормони е прохормонът T_4 . Той може да бъде подложен на активиране чрез дейодинация на вътрешния пръстен от дейодиназите D1 и D2, за да се образува биологично активният тиреоиден хормон T_3 , или подлежи на дейодиниране на външния пръстен от D3, за да се произведе неактивният обратен T_3 (rT_3). По-нататъшното отстраняване на йод от T_3 и rT_3 от същите дейодинази води до образуване на неактивния йодтиронин T_2 .

Свойства, клетъчно местоположение и тъканно разпределение на йодтиронин дейодиназите

Дейодиназа тип I (D1/DIO1)

Йодтиронин дейодиназа тип I (D1) е първата йодтиронин дейодиназа, клонирана при плъхове и идентифицирана като Сес-съдържащ ензим (3). При хората генът DIO1 е локализиран в хромозома 1. Тази дейодиназа е в състояние да дейодинира както външния, така и в по-малка степен вътрешния пръстен на T_4 (Фиг. 1) (4). Дейодинирането на външния пръстен T_4 (ORD) от D1 води до произвеждане на T_3 , а дейодинирането на вътрешния пръстен (IRD) – до това на rT_3 (Фиг. 1). D1 се инхибира от пропилтиоурацил (ПТУ) и показва по-нисък афинитет към T_4 , също така проявява предпочитание към rT_3 като субстрат. Въпреки това, T_4 , сулфатиран във вътрешния му пръстен (T_4S), се дейодинира със

скорост, ускорена 200 пъти, поради намаляване на K_m и увеличаване на V_{max} (5). D1 изисква гутиотреитол (ДТТ) като кофактор, чиято концентрация спомага дейодинирането чрез „линг-понг“ кинетика. Това предполага, че се получава междинен ензим, който може да се възстанови чрез реакция с ДТТ (2).

D1 ензимът се намира в плазмената мембрана и повлиява нивата на циркулиращите T_4 , T_3 и rT_3 (Табл. 1). Експресира се в черния дроб, бъбреците и щитовидната жлеза (1). По отношение физиологията на щитовидната жлеза (1), D1 засилва секрецията на T_3 и превръщането на T_4 в T_3 при пациенти с ендогенен хипертиреозидизъм, водейки до по-високо серумно съотношение на свободен T_3 към свободен T_4 (6). Следователно, един инхибитор на D1 активността, като например ПТУ, има по-силен ефект за намаляване на серумните нива на T_3 в допълнение към блокиране на хормоносинтезата (7)

Таблица 1. Структура и клетъчна биология на дейодиназа тип 1, 2 и 3.

	D1	D2	D3
Хромозомна локализация при хора	Хромозома 1	Хромозома 14	Хромозома 14
Функция	Активираща	Активираща	Инактивираща
T₃ наличност	Извънклетъчна/ Серумни нива	Вътреклетъчна	Вътреклетъчна
Афинитет към T₄	Нисък	Висок	Нисък*
Клетъчна локализация	Плазмена мембрана	Ендоплазматичен ретикулум	Плазмена мембрана
Тъканна експресия	Черен гроб Бъбрек Щитовидна жлеза	Мозък, Хипофиза Кафява мастна тъкан Мускули	Ембрион, Плацентата Мозък, Кожа Панкреасни β-клетки

*D3 има субстратно предпочитание към T₃ в ниско наномоларния диапазон.

Дейодиназа тип II (D2/DIO2)

Йодтироинин дейодиназата тип II (D2) е отговорна главно за превръщането на T₄ в T₃ чрез дейодиназия на външния пръстен и показва три пъти по-висок афинитет към T₄ (8, 9). Разположена е в човешката хромозома 14. Около 40% от T₄, произвеждан ежедневно, се метаболизира до T₃ от D1 и D2, в по-голяма степен от D2 спрямо D1 (1). D2 ензимната активност се регулира от T4 (down-регулация) чрез протеазомно разграждане, което изисква взаимодействие с каталитичния център на протеина (10). Инактивирането на D2 става чрез убиквитинация и нарушаване конформацията на D2:D2 димера, което е критично за неговата ензимна активност (1).

D2 протеинът се намира в ендоплазматичния ретикулум и е силно експресиран в мозъка, хипофизната жлеза, кафявата мастна тъкан, същевременно е по-слабо експресиран в кожата, скелетната мускулатура, скелета, съдовите гладкомускулни влакна и тесисите (9, 11-15). При хора и гризачи кафявата мастна тъкан е намерена като подходящ източник за циркулиращ T₃ (16, 17) (Табл.1).

Дейодиназа тип III (D3/DIO3)

Генът за йодтироинин дейодиназа тип III (D3), DIO3, е разположен върху човешка хромозома 14. D3 ензимната активност в най-голяма степен

медира инактивирането на ТХ чрез превръщане на T₄ в rT₃ и T₃ в 3,3'-T₂ чрез IRD активност (2) (Фиг. 1). Това за първи път бе показано в тъкани, като хомогенизиран мозък на плъхове и човешка плацентата (18, 19). D3 ензимът показва субстратно предпочитание към T₃ спрямо T₄, също така има нужда от високи концентрации на кофактора ДТТ и е устойчив на инхибиране от ПТУ (2).

D3 се локализира в плазмената мембрана, като по-голямата част от молекулата му попада в екстрацелуларния домейн (20). Този ензим е силно експресиран в матката при бременни, плацентата, феталните и неонаталните тъкани, човешкия мозък, кожата и панкреасните клетки (21-23) (Табл. 1). Свързекспресията и ектопичната експресия на D3 са свързани с различни болести и някои видове неоплазми, като хемангиоми (обсъдени по-долу).

Дейодиназни дефицити при мишки

Естествено настъпваща мутация Dio1 при мишка

Естествено настъпваща мутация в гена Dio1 при мишки, причиняваща дефицит на D1 (щам C3H/He), беше идентифицирана през 1993 г. и допринесе за разбирането на дефицита на D1 (3, 24). Berry и сътр. (3) показаха, че D1-дефицитните C3H/He мишки имат повишен серумен

свободен T_4 и нормални серумни нива на TSH и свободен T_3 . Не са измервани серумни нива на rT_3 . Във второ проучване при СЗН/Не мишки Schoenmakers и сътр. (24) наблюдават повишени серумни нива на rT_3 , въпреки че тези мишки имат нормални серумни нива на T_4 и T_3 . TSH не е оценяван. Те правят извода, че нарушението на активността на D1 е възникнало поради предполагаема генетична вариация, която намалява стабилността на Dio1 мРНК или намалява транскрипцията на Dio1 гена.

Дейодиназа тип 1 нокаутирани мишки (Dio1-KO)

Ролята и функцията на D1 по отношение на TH в различни органи е оценена с помощта на D1-дефицитни мишки (Dio1-KO), генерирани чрез целенасочено разрушаване на гена Dio1 (4). Въпреки че серумните нива на TCX и T_3 остават непроменени, T_4 и rT_3 са повишени (4). Освен това, при липса на активност на D1, фекалната екскреция на ендогенни йодтирони е повишена, което показва ролята на D1 за екскреция на TH. Лечението с T_3 има за резултат по-високи серумни нива на T_3 и по-тежък по степен хипертиреозидизъм при Dio1-KO мишки. Не са наблюдавани репродуктивни нарушения и отклонения в растежа и развитието. Трябва да се отбележи, че при хетерозиготни Dio1 нулеви мишки са открити повишени серумни нива на rT_3 и повишено съотношение rT_3/T_3 (25). При еутиреоидни мишки D1 изглежда не е есенциална дейодиназа

за поддържане нивата на T_3 и като цяло Dio1-KO имат лекостепенна фенотипна изява (Табл. 2).

Дейодиназа тип 2 нокаутирани мишки (Dio2-KO)

Щам мишки с липсваща активност на D2 е разработен чрез изтриване на 72% от кодиращата област на Dio2, включително частта, необходима за ензимната активност. Резултатът е пълно отсъствие на D2 активност в изследваните тъкани, включително хипофиза, мозък, кафява мастна тъкан и щитовидна жлеза (26). При възрастни Dio2-KO мишки серумните нива на T_3 са подобни на тези при дивия тип (WT) мишки, докато T_4 и TCX са леко повишени в сравнение с WT мишките (Табл. 2). В друго проучване при същите мишки, серумните T_4 , T_3 и rT_3 са подобни на нивата при WT мишки, а серумният TCX е значително по-висок при Dio2-KO мишките (27). Трябва да се отбележи, че редовната диета, използвана в последното проучване, е с по-ниско съдържание на йод в сравнение със стандартната диета при мишки, въпреки че не е истинска йод-дефицитна диета. Това може да е допринесло за наблюдаваните разлики в тестовете, отразяващи функцията на щитовидната жлеза. Въпреки че T_4 и T_3 успяват да потиснат серумните нива на TCX при хипотиреоидни WT мишки, само T_3 е способен да потисне TCX при Dio2-KO мишки, което съответства на фенотип с хипофизарна резистентност към T_4 (26).

Не са наблюдавани соматични аномалии, дефек-

Таблица 2. Фенотип на мишки с дейодиназен дефицит.
Адаптирано по Gereben et al. Endocrine review 2008;29(7):898-938.

КО модели	Dio1-KO	Dio2-KO	Dio3-KO	Sbp2-iCKO
Серумен T_4	Увеличен	Увеличен / Нормален	Намален	Увеличен
Серумен T_3	Нормален	Нормален	Намален	Нормален
Серумен rT_3	Увеличен	Увеличен / Нормален	Не се съобщава	Увеличен
TCX	Нормален	Увеличен	Нормален или леко увеличен	Увеличен
Системен фенотип	Еутиреоиден	Еутиреоиден	Хипотиреоиден	Еутиреоиден / Хипотиреоиден
Репродукция	Нормална	Нормална	Нарушена	Нарушена

ти в развитието или репродуктивни нарушения, въпреки че 9% от мъжките мишки са с леко забавяне в растежа (26) (Табл. 2).

Дейодиназа тип 3 нокаутирани мишки (Dio3-KO)

Нови разбирания за значението на тип III дейодиназа (D3) са получени от изследването на *Dio3* нокаутирани мишки (*Dio3-KO*), без откриваема активност на D3, в следствие на разрушаване на гена *Dio3* (28). Тези мишки развиват перинатална тиреотоксикоза, последвана от централен хипотиреозизъм в зряла възраст. В началото на живота *Dio3-KO* мишките имат ниски нива на разграждане на T_3 , повишени серумни нива на T_3 , придружени от ефект върху T_3 -регулируемите гени в мозъка (28). За разлика от това, възрастни *Dio3-KO* мишки показват понижени серумни нива на T_4 и T_3 , с леко повишен до нормален ТСХ, което съответства на централен хипотиреозизъм. Откриват се хипотиреозизъм в периферните тъкани и ниско съдържание на T_3 в хипоталамуса, като повишената експресия на тиреотропин-освобождаващия хормон (ТРХ) потвърждава централния хипотиреозизъм. *Dio3-KO* мишките показват също ниска фертилност и забавен растеж и при двата пола (28) (Табл. 2). Допълнителни изследвания разкриват, че *Dio3-KO* мишките показват нарушен отговор към стимулация с ТСХ и ТРХ. Антитиреозното медикаментозно лечение причинява тежък хипотиреозизъм, а T_3 заместителната терапия води до високо ниво на T_3 , разкриващо нарушен клирънс на T_3 в тиреозидната ос при липса на D3 активност (29).

Хетерозиготните *Dio3-KO* мишки потвърдиха, че генът *Dio3* е импринтиран (30). При фетусите на ембрионни дни 14 до 17, активността на D3 е намалена в главата, крайниците, черния гроб и тялото, когато генетично модифицираният дефицит е наследен от бащата и не се наблюдават промени в неговата активност, когато се унаследи от майката, което показва бащин импринтинг на *Dio3* гена (30).

Дейодиназни дефицити при хора

Дейодиназа тип 1 (DIO1) генни мутации

Въпреки че функционалната роля на дейодиназните ензими е старателно проучена, до 2020 г. не са описани мутации в човешки *DIOs* гени. Установени са два патогенни варианта в *DIO1* гена [с.282С>А:р.Аsn94Lys (N94K) и с.603G>А:р. Met201Ile (M201I)], които причиняват абнормен

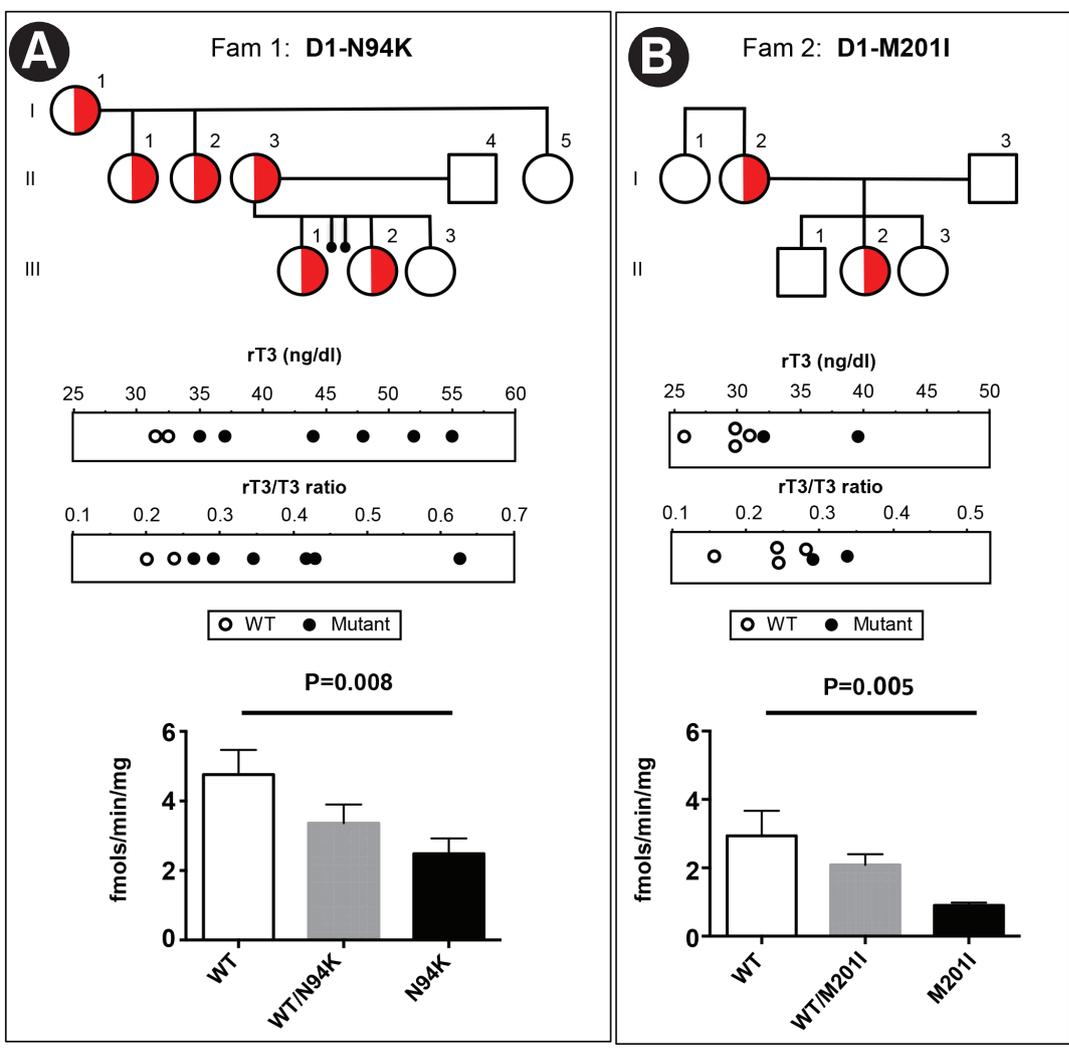
метаболизъм на тиреоидните хормони при две несвързани семейства (25). Засегнатите членове на тези семейства имат повишени серумни нива на rT_3 и съотношение rT_3/T_3 (Фиг. 2), подобно на *Dio1* хетерозиготно-нулевите мишки. За да се оцени *in vitro* функционалната активност на мутантния D1 протеин (D1-N94K и D1-M201I), беше извършена място-насочена мутагенеза за получаване на рсDNA3 плазмиди, експресиращи рD1-WT, рD1-N94K или рD1-M201I и векторите бяха преходно ко-трансфектирани с рGFP в човешки ембрионални бъбречни епителни клетки (HEK-293). За да се направи разлика между рD1-WT и рD1-N94K или рD1-M201I каталитичната функция на мутантите, беше измерена фракцията на активност D1 на дейодирател 125IT4 като мутантните D1 протеини показват 2-3 пъти по-висок $K_m[T_4]$, което разкрива по-нисък афинитет на субстрата и по-бавна ензимна скорост, предполагащо критично структурно увреждане на D1 протеина. При пациентите с лек фенотип не са показани добавяне на тиреоидни хормони или заместителна терапия.

Доколкото ни е известно, не са докладвани патогенни варианти при *DIO2* и *DIO3*.

Дефекти в синтеза на селенопротеин

Дейодиназите са селеноензими и съдържат рядката аминокиселина селеноцистеин (Sec) в активния си център. Въмъкването на Sec в протеините изисква прекодиране на специфичен UGA стоп кодон чрез сложен процес, запазен в еукариотите (Фиг. 3А). По този начин генетичните дефекти в компонентите на механизма за селенопротеинов синтез имат потенциал да променят активността на дейодиназите. Един такъв дефект е идентифициран в гена, кодиращ протеин 2, свързващ последователността на въмъкване на селеноцистеин (*SBP2*) – съществен фактор, необходим за включването на Sec в селенопротеините (31). Пациентите с дефицит на *SBP2* проявяват характерен тиреоиден фенотип с повишени серумни нива на T_4 и rT_3 , намален T_3 и нормален или леко повишен ТСХ (Фиг. 3В). Тъй като този дефект променя синтеза на всички 25 известни селенопротеини, хората с рецесивни *SBP2* мутации проявяват сложен мултиорганен синдром със забавяне на растежа и развитието, нарушена двигателна координация, инфертилитет при мъжкия пол и груги по-слабо проучени компоненти (32).

За да се разберат подлежащите механизми на горните фенотипове, са генерирани условно *Sbp2* нокаутирани мишки (iCKO), тъй като пълното елиминиране на *Sbp2* е летално. Мишките с дефицит на *Sbp2* проявяват тиреоиден фено-

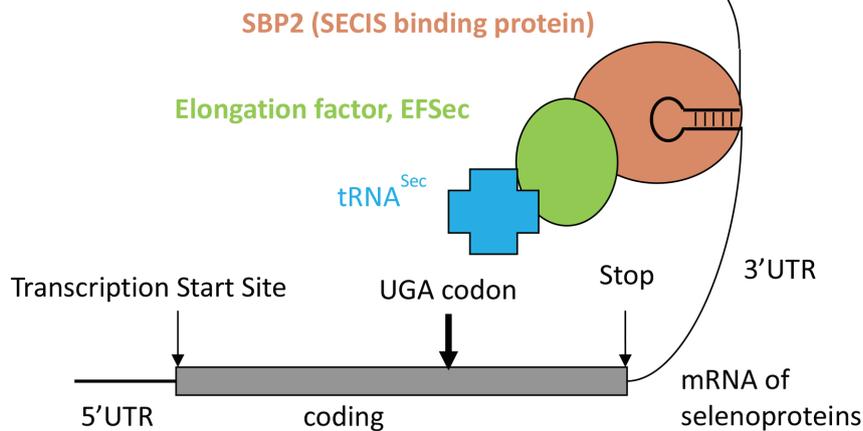


Фигура 2.

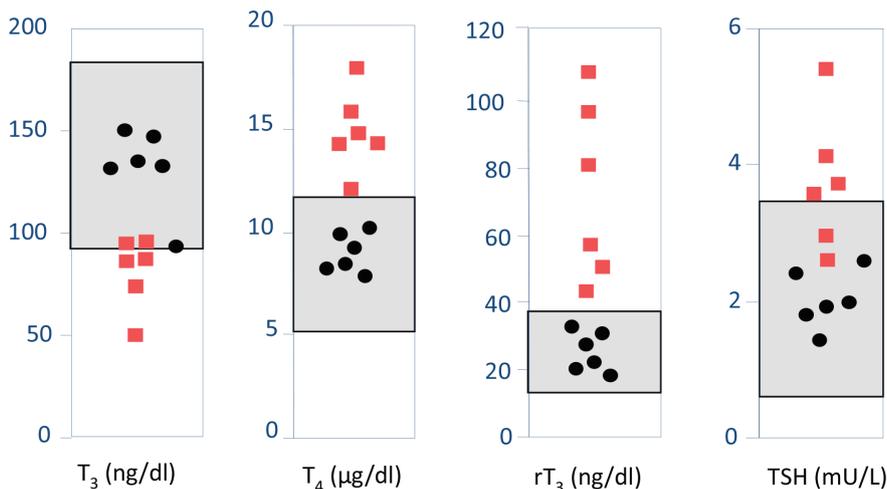
Родословия, резултати от функционални тестове на щитовидната жлеза и *in vitro* тестове на гвете семейства с D1 генна мутация. (A) фамилия 1 с D1-N94K и (B) фамилия 2, с D1-M201I. Серумните концентрации на rT_3 и съотношението rT_3/T_3 за засегнатите и незасегнатите членове на семейството са представени графично. Ензимната активност, измерена в клетки, експресиращи WT и двата мутантни D1 самостоятелно и в комбинация с WT, симулиращи хетерозиготно засегнатите пациенти, е показана в долната част на фигурата. Резултатите се изразяват като средна стойност \pm стандартна грешка на три независими измервания във всяко състояние. Стойностите на P са получени чрез еднопосочна ANOVA.

тип, подобен на този при хора с високи серумни нива на T_4 и rT_3 . С известна разлика в сравнение с хората с дефицит на SBP2, серумните нива на TCX са повишени и нивата на T3 са нормални при мишки с дефицит на Sbp2, което отразява разликите в регулирането на тиреоидната ос и различния индивидуален принос на дейодиназите при хората и мишките (33). Подробни изследвания при тези мишки демонстрират намалена експресия на Dio1 и намалена D1 активност в черния

гроб, намалена активност на D2 и намалена експресия на Dio3 в главния мозък. Като цяло, дефицитите на трите дейодинази в различни тъкани, както и специфичният принос от всички нива на щитовидната ос водят до характерния тиреоиден фенотип (34). Освен това е установено, че други селенопротеини са редуцирани в мозъка, черния гроб и серума, като по този начин потвърждават системното увреждане на селенопротеиновата синтеза (33).

A**Фигура 3.**

(А) Схематично представяне на механизма за синтез на селенопротеин, необходим за прекодиране на UGA стоп кодон в селеноцистеин (Sec). Специфичните елементи в структурата на селенопротеинова мРНК са UGA кодон и РНК верига с 3'UTR, SECIS (последователност на включване на Sec). Представени са някои от факторите, необходими за включването на Sec, включително SBP2 (SECIS свързващ протеин 2), показан в сиви квадратчета. (В) Отражени са тестове, показващи функцията на щитовидната жлеза в серум на пациенти с дефицит на SBP2 (в квадратчета) от няколко семейства, в сравнение с незасегнати членове на семейството (кръзчета).

B

Придобити аномалии на дейодиназата

Дейодинази при синдром на изключване на тиреоидно заболяване (NTIS)

Аномалии във функцията на щитовидната жлеза се наблюдават при нетиреоидни заболявания, особено когато те са остри. По-чести са отклоненията при хронични заболявания, които включват нисък серумен T₃ и висок rT₃, но нормален или нисък T₄ и ТСХ. Посочени като синдром на изключване на тиреоидно заболяване (NTIS) и еутиреоиден болестен синдром (ESS), термините са подвеждащи, тъй като първият не посочва последствията, а вторият предполага еутиреоидизъм без категорично доказателство. Такива отклонения във функцията на щитовидната жлеза се наблюдават при гладуване, сепсис, оперативни интервенции, инфаркт на миокарда, байпас,

трансплантация на костен мозък и вероятно всяко тежко заболяване (35). Първоначално се установяват ниски серумни нива на T₃ и повишени rT₃, поради инхибиране активността на D1. С напредване на заболяването настъпва допълнително намаляване на серумните T₃ и T₄ и повишаване на rT₃ поради едновременно повишената активност на инактивиращия ензим D3, който подпомага метаболизма на T₃ и T₄ (35). Този компенсаторен механизъм е в състояние да спести енергия чрез намаляване на серумните нива на T₃ и скоростта на основната обмяна.

Дейодиназа 3 при хемангиоми и други тумори

Съобщава се за свръхекспресия на нивата на D3 при различни видове тумори, например хемангиоми. Това е често срещан тумор в ранна дет-

ска възраст и е доказано, че в редки случаи причинява паранеопластичен синдром, известен като консумативен хипотиреоидизъм, описан за първи път при новородени деца с масивни черnodробни хемангиоми (36). Намерено е, че лечението с високи дози хормонозаместителна терапия възстановява нормалните нива на серумен ТСХ. Диагнозата се поставя чрез оценка активността на D3 в туморната тъкан и може да бъде подкрепена от откриване на повишени серумни нива на rT_3 и тиреоглобулин (37). Подобен модел на функционални тиреоидни тестове и подлежащ механизъм са докладвани при пациенти с метастатичен бърбечно-клетъчен карцином или стомашно-чревни стромални тумори, лекувани с инхибитор на тирозин киназата сунитиниб (38).

Благодарности

Работата е подкрепена отчасти чрез грантове DK15070 (за S.R.) и DK110323 (за A.M.D.) от Националните Институты на Здравето, САЩ.

Редакцията изказва благодарност за превода на обзора на д-р Елена Бечева, Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, МУ, Пловдив

Address for correspondence:

Samuel Refetoff

University of Chicago, MC3090
5841 South Maryland Avenue
Chicago, IL 6067, USA
Tel: (1-773) 702-6939
e-mail: refetoff@uchicago.edu

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

Properties and Function of Iodothyronine Deiodinases Based on Studies of Genetic Defects in Mice and Humans

França, Monica M.¹, Dumitrescu, Alexandra M.^{1,3}, Refetoff, Samuel^{1,2,4}

Department of Medicine¹ and Pediatrics²,

Committee on Molecular Metabolism and Nutrition³

Committee on Genetics⁴, The University of Chicago, Chicago, USA

Submitted: 18. 10. 2020

Accepted: 26. 10. 2020

Abstract

The discovery of triiodothyronine (T_3) and its binding to specific receptors have been instrumental in understanding the mode of thyroid hormone action. Equally so, the generation of T_3 from its precursor T_4 and secreted by the thyroid gland, have elucidated how the proper amount of active hormone is supplied to organs and cells in a specific manner and in tune with changing requirements. The latter is achieved through the action of specific iodothyronine deiodinases. This minireview addresses the properties and function of iodothyronine deiodinases, and their control of T_3 supply to target tissues, using as model genetic errors of nature in human and mice as well as laboratory induced mutations in mice.

Key words:

DIO, iodothyronine deiodinase, mutations, humans, mice

Introduction

Thyroid hormones (TH) cross cell membranes through specific transporters belonging to the MCT, OATP, and LAT families. The monocarboxylate transporter 8 (MCT8) is highly efficient and specific for the thyroid hormones 3,3',5,5'-tetraiodothyronine (thyroxine or T_4) and 3,3',5-triiodothyronine (T_3) (1). T_4 is a precursor that can be activated or inactivated by a group of selenocysteine (Sec)-containing enzymes. These selenoenzymes have properties of removing iodine atoms from specific position on the iodothyronine molecules, thus named deiodinases. The deiodination process catalyzes the first step of TH action by regulating the availability of the metabolically active T_3 (1). This is achieved by removal of iodine-5' from the outer ring T_4 . The reaction is catalyzed by the iodothyronine deiodinases type I (D1) and type II (D2). An inner ring deiodination (iodine-5) is catalyzed principally by deiodinase III (D3) producing 5',3,3'-triiodothyronine (reverse T_3 or rT_3), and to a lesser extent also by D1 (Figure 1).

TH control positively D1 and D3 expression and negatively D2 expression. D1 seems to have an important effect in hyperthyroid states and controls the circu-

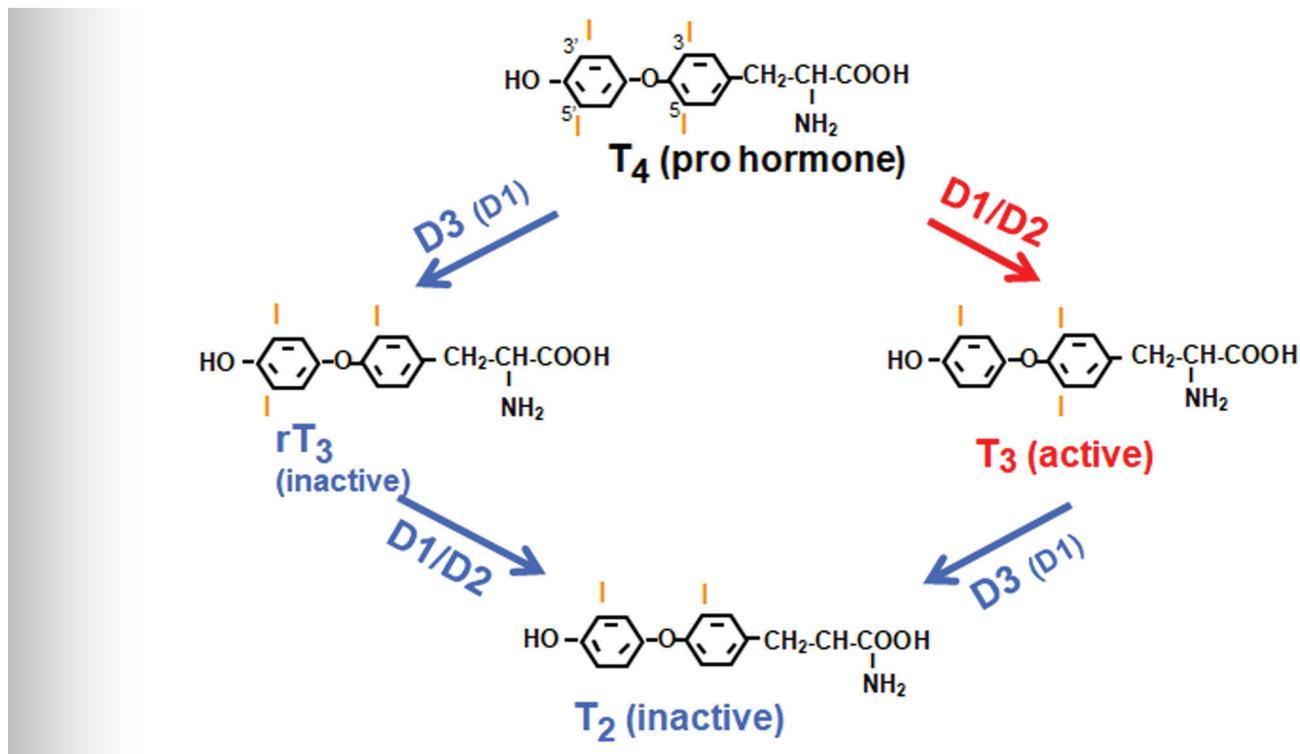
lating serum T_3 , while D2 is more relevant in hypothyroid states and controls the intracellular T_3 (2).

Properties location and tissue distribution of iodothyronine deiodinases

Type I deiodinase (D1/DIO1)

The type I iodothyronine deiodinase (D1) was the first iodothyronine deiodinase cloned in rat and identified as Sec-containing enzyme (3). In humans, the DIO1 gene is located on chromosome 1. This deiodinase is able to deiodinate both outer and, to a lesser degree, inner ring of T_4 (Figure 1) (4). The deiodination of the T_4 outer ring (ORD) by D1 produces T_3 and the inner ring deiodination (IRD) produces rT_3 (Figure 1). D1 is inhibited by propylthiouracil (PTU) and shows lower affinity for T_4 exhibiting preference for rT_3 as substrate. However, a T_4 sulfated in its inner ring, T4S, is deiodinated at a rate accelerated 200-fold due to a decrease in apparent K_m and an increase in V_{max} (5). D1 requires dithiothreitol (DTT) as cofactor, the concentration of which promotes deiodination by ping-pong kinetics. This suggests that an intermediate enzyme is produced and is able to be regenerated by reaction with DTT (2).

Figure 1.



The pathways of iodothyronine deiodination. The main product of thyroid hormone secretion is the pro-hormone T₄. It can undergo activation through inner ring deiodination by the deiodinases D1 and D2 to form the biologically active thyroid hormone T₃ or undergo outer ring deiodination by D3 to produce the inactive rT₃. Further removal an iodine from T₃ and rT₃ by the same deiodinases yields the inactive iodothyronine T₂.

The D1 enzyme is located in the plasma membrane and affects the levels of circulated T₄, T₃, and rT₃ (Table 1). It is expressed in liver, kidney, and thyroid (1).

In thyroid physiology (1), D1 enhances thyroidal T₃ secretion and T₄ to T₃ conversion in patients with endogenous hyperthyroidism, producing a higher serum free T₃ to free T₄ ratio (6). Therefore, an inhibitor of D1 activity, such as PTU has a stronger effect in decreasing serum T₃ levels in addition to blocking hormone synthesis (7).

Type II deiodinase (D2/DIO2)

The type II iodothyronine deiodinase (D2) is mainly responsible for converting T₄ to T₃ via outer ring deiodination and shows three orders of magnitude higher affinity for T₄ (8, 9). It is located on human chromosome 14. Around 40% of the T₄ produced daily is metabolized to T₃ by D1 and D2, with a larger contribution from D2 relative to D1 (1). D2 enzymatic activity is downregulated by T₄ through proteasomal degradation that requires interaction with the catalytic center of the protein (10). The inactivation of D2 occurs through ubiquitination by disrupting the conformation of the D2:D2 dimer that is critical for its enzymatic activity (1).

D2 protein is located in the endoplasmic reticulum and is highly expressed in brain, pituitary gland, brown adipose tissue (BAT), whereas it is less expressed in skin, skeletal muscle, skeleton, vascular smooth muscle, and testis (9, 11-15). In humans and rodents, BAT has been shown as relevant source of circulating T₃ (16, 17) (Table 1).

Type III deiodinase (D3/DIO3)

The type III iodothyronine deiodinase (D3) gene, DIO3, is located on human chromosome 14. D3 enzymatic activity exclusively mediates the inactivation of TH through conversion of T₄ to rT₃ and T₃ to 3,3'-T₂ via IRD activity (2) (Figure 1). This was first demonstrated in tissues, such as rat brain homogenates and human placenta (18, 19). The D3 enzyme displays a substrate preference for T₃ vs T₄, needs high concentrations of the cofactor DTT, and is resistant to inhibition by PTU (2).

D3 is located in the plasma membrane with most of its molecule in the extracellular domain (20). This enzyme is highly expressed in the pregnant uterus, placenta, fetal and neonatal tissues, human brain, skin and pancreatic cells (21-23) (Table 1). Overexpression and ectopic expression of D3 have been associated with

Table 1. Structure and Cell Biology of Deiodinase Type 1, 2, and 3.

	D1	D2	D3
Chromosomal location in humans	Chr 1	Chr 14	Chr 14
Function	Activating	Activating	Inactivating
T₃ availability	Extracellular/ serum levels	Intracellular	Intracellular
Affinity for T₄	Low	High	Low*
Cellular Location	Plasma membrane	Endoplasmic reticulum	Plasma membrane
Tissue Expression	Liver Kidney Thyroid Brain	Brain, Pituitary, BAT Muscle	Embryo, Placenta Brain, Skin Pancreatic β -cells

BAT: brown adipose tissue *D3 has substrate preference for T₃ in the low nanomolar range.

illness and some types of neoplasms, such as hemangiomas (discussed below).

Deiodinase deficiencies in mice

Naturally occurring mutation in mouse *Dio1*

A naturally occurring mutation in the *Dio1* gene in mice causing D1 deficiency (C3H/He strain) was identified in 1993 and contributed to the understanding of D1 deficiency (3, 24).

Berry and collaborators (3) showed that the D1-deficient C3H/He mice had increased serum free T₄ and normal serum of TSH and free T₃. No serum rT₃ levels were measured. In a second study of the C3H/He mice Schoenmakers and colleagues (24) observed elevated serum rT₃ levels, even though these mice had normal serum T₄ and T₃ levels. TSH was not evaluated. They concluded that impairment of D1 activity occurred due to a putative genetic variation that reduced stability of the *Dio1* mRNA or decreased transcription of *Dio1* gene.

Type 1 deiodinase knockout mice (*Dio1-KO*)

The role and function of D1 in TH economy in different organs was evaluated using a D1-deficient mouse (*Dio1-KO*) generated by targeted disruption of the *Dio1* gene (4). Although serum levels of thyroid-stimulating hormone (TSH) and T₃ remained unchanged, T₄ and rT₃ were elevated (4). In addition, in absence of D1 activity, fecal excretion of endogenous iodothyronines was elevated indicating a role for D1 in TH excretion. Treatment with T₃ resulted in a higher serum T₃ levels and a greater degree of hyperthyroidism in D1-KO mice. No

reproductive, developmental and growth impairments were observed. Of note, elevated serum rT₃ levels and rT₃/T₃ ratios were found in heterozygous *Dio1* null mice (25). In euthyroid mice, D1 seems not to be an essential deiodinase for the maintenance of the T₃ levels and overall, *Dio1-KO* has a mild phenotype (Table 2).

Type 2 deiodinase knockout mice (*Dio2-KO*)

A mouse strain lacking D2 activity was developed by deleting 72% of the coding region of *Dio2*, including the part necessary for enzymatic activity. The result is a complete absence of D2 activity in the tissues tested, including pituitary, brain, BAT and thyroid (26).

In adult *Dio2-KO* mice, serum T₃ levels were similar to those of WT mice, while T₄ and TSH were both mildly elevated compared to WT (Table 2). In another study of the same mice, serum T₄, T₃, and rT₃ were similar to levels in WT mice, and serum TSH was significantly higher in the *Dio2-KO* mice (27). Of note, the regular diet used in this later study contained lower iodine than the standard mouse diet, although it was not an actual iodine deficient diet. This might have contributed to the thyroid function tests (TFT) differences observed.

Although both T₄ and T₃ were able to suppress serum TSH levels in hypothyroid WT mice, only T₃ was capable to suppress TSH in *Dio2-KO* mice, consistent with a phenotype of pituitary resistance to T₄ (26). No somatic abnormalities, developmental defects, or reproductive abnormalities were observed, although 9% of males presented with mild growth retardation (26) (Table 2).

Type 3 deiodinase knockout mice (Dio3-KO)

Novel insights about the importance of type III deiodinase (D3) were obtained from the study of a *Dio3* knockout (*Dio3*-KO) mouse, devoid of detectable D3 activity generated by disruption of the *Dio3* gene (28). These mice developed perinatal thyrotoxicosis followed by central hypothyroidism in adulthood. Early in life *Dio3*-KO mice have low rates of T_3 degradation, increased serum levels of T_3 accompanied by effect on T_3 -regulated genes in the brain (28). In contrast, adult *Dio3*-KO mice exhibited decreased levels of serum T_4 and T_3 , with slightly elevated to normal TSH, consistent with central hypothyroidism. A peripheral tissue hypothyroidism and low T_3 content in hypothalamus were demonstrated, with increased expression of thyrotropin-releasing hormone (TRH) levels confirmed the central hypothyroidism. *Dio3*-KO mice also displayed low fertility and delayed growth of both sexes (28) (Table 2). Additional evidence showed that *Dio3*-KO mice exhibited impaired TSH and TRH stimulation response. Antithyroid drug treatment caused severe hypothyroidism and T_3 replacement therapy showed high level of T_3 demonstrating an impaired clearance of T_3 in thyroid axis in absence of D3 activity (29).

Heterozygous *Dio3*-KO mice confirmed that the *Dio3* gene is imprinted (30). In fetuses (E14 to E18), D3 activity was reduced in the head, limbs, liver and body when the genetically engineered deficiency was inherited from the father and no changes in its activity was seen when inherited from the mother, indicating paternal imprinting of the *Dio3* gene (30).

Deiodinase deficiencies in humans

Type 1 deiodinase (DIO1) gene mutations

Although the functional roles of deiodinase enzymes have been thoroughly investigated, no mutations in human *DIOs* genes have been described until 2020. Two pathogenic variants in the *DIO1* gene (c.282C>A:p.Asn94Lys and c.603G>A:p.Met201Ile) were found to cause abnormal thyroid hormone metabolism in two unrelated families (25). Affected members of these families presented with elevated serum rT_3 levels and rT_3/T_3 ratios (Figure 2), similar to mice *Dio1* heterozygous-null. To assess the in vitro functional activity of the mutant D1 protein, (D1-N94K and D1-M201I), site-directed mutagenesis was performed to obtain pcDNA3 plasmids expressing pD1-WT, pD1-N94K or pD1-M201I and the vectors were transiently co-transfected with pGFP in human embryonic kidney epithelial cells (HEK-293). To distinguish between pD1-WT and pD1-N94K or pD1-M201I mutants' catalytic function, the D1 activity fraction of 125IT4 deiodinated was measured and the mutant D1 proteins exhibit 2-3-fold higher $K_m[T_4]$, indicating lower substrate affinity and slower enzyme velocity, which suggest a critical structural impaired of D1 protein. No thyroid hormone supplementation of replacement therapy has been indicated for these patients presenting with a mild phenotype (25).

To our knowledge, no pathogenic variants have been reported in *DIO2* and *DIO3*.

Table 2. Phenotype of Mice Deficient in Deiodinase
Adapted from Gereben et al., *Endocrine review* 2008, 29(7):898-938.
KO: Knockout; iCKO: inducible conditional KO; NR: not reported.

KO models	<i>Dio1</i> -KO	<i>Dio2</i> -KO	<i>Dio3</i> -KO	<i>Sbp2</i> -iCKO
Serum T_4	Elevated	Elevated/ Normal	Decreased	Elevated
Serum T_3	Normal	Normal	Decreased	Normal
Serum rT_3	Elevated	Elevated/ Normal	NR	Elevated
TSH	Normal	Elevated	Normal or slightly elevated	Elevated
Systemic phenotype	Euthyroid	Euthyroid	Hypothyroid	Euthyroid/ hypothyroid
Reproduction	Normal	Normal	Impaired	Impaired

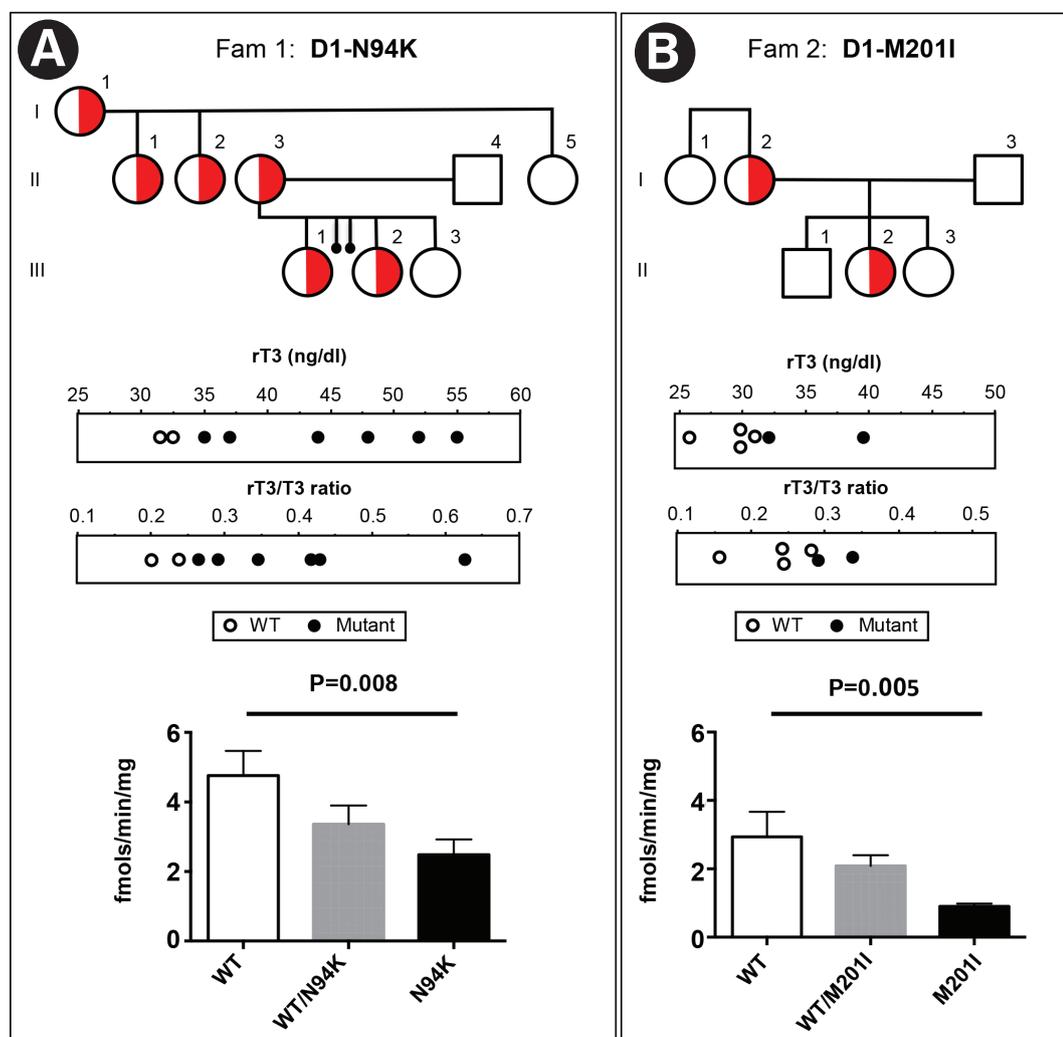


Figure 2.

Pedigrees, TFT results and in vitro tests of the two families with D1 gene mutation. (A) family 1 harboring D1-N94K and (B) family 2, harboring D1-M201I. Serum rT_3 concentrations and rT_3/T_3 ratios for affected and unaffected family members are presented graphically. The enzymatic activity measured in cells expressing the WT and the two mutant D1 alone and in combination with the WT, simulating the heterozygous affected patients is shown in the bottom of the figure. Results are expressed as mean \pm standard error of three independent measurements in each condition. P values were obtained by one-way ANOVA.

Selenoprotein synthesis defects

Deiodinases are selenoenzymes and harbor the rare amino acid selenocysteine (Sec) in the active center. The insertion of Sec into proteins requires recoding of a specific UGA stop codon through a complex process conserved in eukaryotes (Figure 3A). Thus, genetic defects in components of the selenoprotein synthesis machinery have the potential to alter deiodinase activities. One such defect was identified in the gene encoding for selenocysteine insertion sequence binding protein 2 (SBP2), an essential factor required for Sec incorporation into selenoproteins (31). Patients with SBP2 deficiency manifest a characteristic thyroid phenotype with elevated serum T_4 and rT_3 levels, decreased

T_3 and normal or slightly elevated TSH (Figure 3B). As this defect alters the synthesis of all 25 known selenoproteins, humans with recessive SBP2 mutations manifest a complex multiorgan syndrome with growth and developmental delay, impaired motor coordination and male infertility among other less well investigated features (32). To understand the underlying mechanisms for these phenotypes, the *Sbp2* inducible conditional knockout (iCKO) mice were generated as full knockout of *Sbp2* is lethal. The *Sbp2* deficient mice manifest a thyroid phenotype similar to that in humans with high serum T_4 and rT_3 levels. Slightly different from humans with SBP2 deficiency, serum TSH levels are elevated and T_3 levels are normal in *Sbp2* deficient mice, reflecting differences in thyroid axis regulation and different

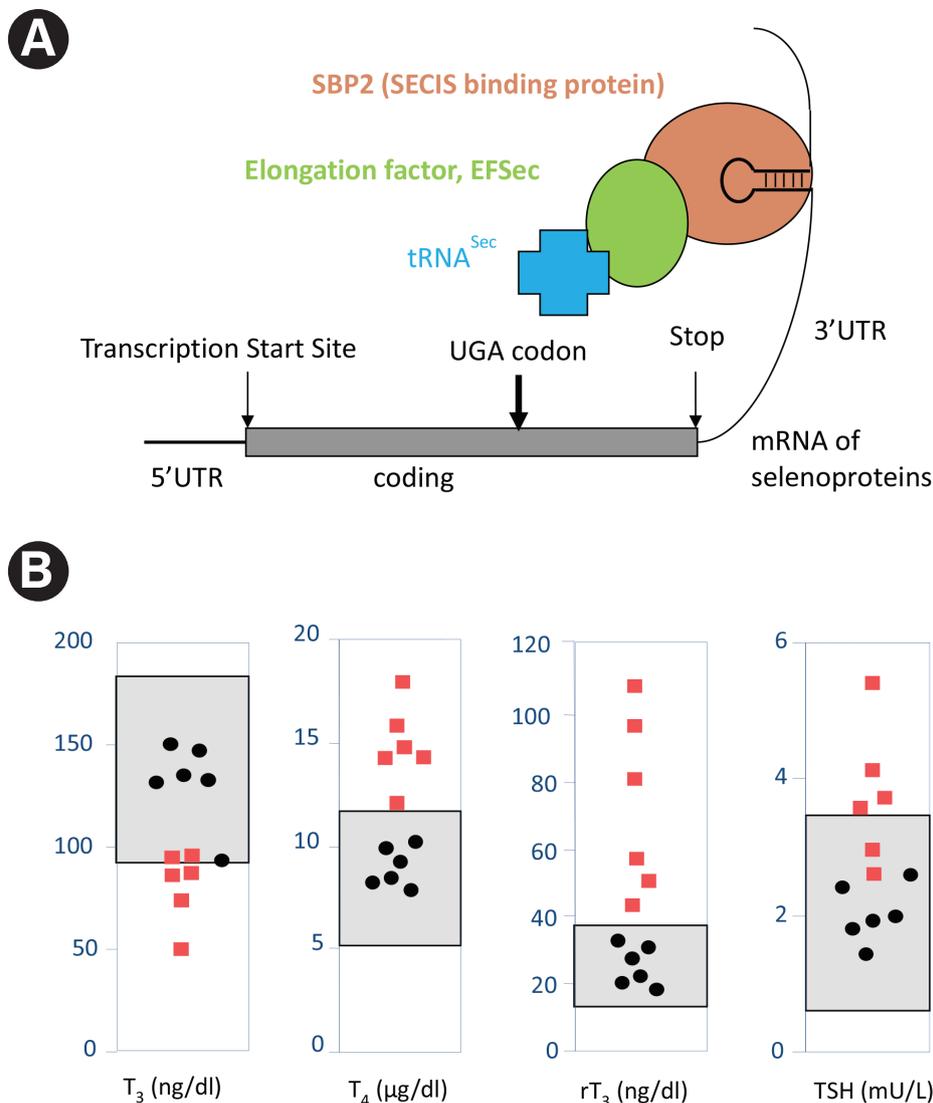


Figure 3.

(A) Schematic representation of the selenoprotein synthesis machinery needed to recode a UGA stop codon to Selenocysteine (Sec). The specific elements in the structure of a selenoprotein mRNA are an in frame UGA codon and a RNA stem-loop structure in the 3'UTR, SECIS (Sec incorporation sequence). Some of the factors required for Sec incorporation are represented, including SBP2 (SECIS binding protein 2) shown in red. (B) Serum thyroid function tests of patients with SBP2 deficiency (in red squares) from several families, compared to unaffected family members (black circles).

individual contributions of the deiodinases between humans and mice (33). Detailed investigations in these mice demonstrated decreased *Dio1* expression and D1 activity in liver, decreased D2 activity and reduced *Dio3* expression in cerebrum. Overall, deficiencies of all three deiodinases in various tissues and specific contributions from all levels of the thyroid axis result in the characteristic thyroid phenotype (34). In addition, other selenoproteins were found decreased in brain, liver and serum, thus confirming systemic impairment in selenoprotein synthesis (33).

Acquired deiodinase abnormalities.

Deiodinases in non-thyroidal illness syndrome (NTIS)

Abnormalities in thyroid function are seen in non-thyroidal illness, particularly when acute. The more

common are the TFT abnormalities in chronic illness, that include low serum T₃ and high rT₃ but normal or low T₄ and TSH. Referred to as non-thyroidal illness syndrome (NTIS), and euthyroid sick syndrome (ESS), these terms are misleading because the first does not indicate the consequence and the second assumes euthyroidism without definite proof. Such thyroid tests abnormalities are observed in fasting, sepsis, surgery, myocardial infarction, bypass, bone marrow transplantation, and probably any severe illness (35). Initially, low serum T₃ levels and elevated rT₃ are found, due to an inhibition of D1 activity. As the illness progress, further decrease in serum T₃ and T₄ and increase in rT₃ occur due to the simultaneous increased activity of the inactivating enzyme D3 which promotes metabolism of T₃ and T₄ (35). This compensatory mechanism is able to conserve energy by decreasing serum T₃ levels and basic metabolic rate.

Deiodinase 3 in hemangiomas and other tumors

The overexpression of D3 levels has been reported in different types of tumors, such as hemangiomas. This is a common infantile tumor, and on rare occasions it was shown to cause a paraneoplastic syndrome known as consumptive hypothyroidism, first described in newborns with massive hepatic hemangiomas (36). Treatment with high doses of thyroid replacement therapy were shown to restore normal levels of serum TSH. The diagnosis is obtained from the evaluation of D3 activity in the tumor tissue and it can be supported by finding

elevated serum rT3 and thyroglobulin levels (37). A similar pattern of thyroid tests and underlying mechanism were reported in patients presenting with metastatic renal cell carcinoma or gastrointestinal stromal tumors treated with the tyrosine kinase inhibitor sunitinib (38).

Acknowledgments

Supported in part by grants DK15070 (to S.R.) and DK110323 (to A.M.D.) from the National Institutes of Health, USA

References

1. **Bianco AC, Dumitrescu A, Gereben B, Ribeiro MO, Fonseca TL, Fernandes GW, et al.** Paradigms of Dynamic Control of Thyroid Hormone Signaling. *Endocr Rev.* 2019; 40(4): 1000-1047.
2. **Peeters RP, Visser TJ.** Metabolism of Thyroid Hormone. Feinglod KR AB, Boyce A, et al., editors., editor: *MD-Text.com.Inc.: South Dartmouth (MA), 2000.*; 2017.
3. **Berry MJ, Grieco D, Taylor BA, Maia AL, Kieffer JD, Beamer W, et al.** Physiological and genetic analyses of inbred mouse strains with a type I iodothyronine 5' deiodinase deficiency. *J Clin Invest.* 1993; 92(3): 1517-1528.
4. **Schneider MJ, Fiering SN, Thai B, Wu SY, St Germain E, Parlow AF, et al.** Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology.* 2006; 147(1): 580-589.
5. **Visser TJ.** Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Chem Biol Interact.* 1994; 92(1-3): 293-303.
6. **Ito M, Toyoda N, Nomura E, Takamura Y, Amino N, Iwasaka T, et al.** Type 1 and type 2 iodothyronine deiodinases in the thyroid gland of patients with 3,5,3'-triiodothyronine-predominant Graves' disease. *Eur J Endocrinol.* 2011; 164(1): 95-100.
7. **Abuid J, Larsen PR.** Triiodothyronine and thyroxine in hyperthyroidism. Comparison of the acute changes during therapy with antithyroid agents. *J Clin Invest.* 1974; 54(1): 201-208.
8. **Larsen PR, Silva JE, Kaplan MM.** Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications. *Endocr Rev.* 1981; 2(1): 87-102.
9. **Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, et al.** Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev.* 2008; 29(7): 898-938.
10. **Steinsapir J, Bianco AC, Buettner C, Harney J, Larsen PR.** Substrate-induced down-regulation of human type 2 deiodinase (hD2) is mediated through proteasomal degradation and requires interaction with the enzyme's active center. *Endocrinology.* 2000; 141(3): 1127-1135.
11. **Hosoi Y, Murakami M, Mizuma H, Ogiwara T, Imamura M, Mori M.** Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in cultured human skeletal muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(9): 3293-3300.
12. **Mizuma H, Murakami M, Mori M.** Thyroid hormone activation in human vascular smooth muscle cells: expression of type II iodothyronine deiodinase. *Circ Res.* 2001; 88(3): 313-318.
13. **Wajner SM, dos Santos Wagner M, Melo RC, Parreira GG, Chiarini-Garcia H, Bianco AC, et al.** Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in germ cells of adult rat testis. *J Endocrinol.* 2007; 194(1): 47-54.
14. **Williams AJ, Robson H, Kester MHA, van Leeuwen JPTM, Shalet SM, Visser TJ, et al.** Iodothyronine deiodinase enzyme activities in bone. *Bone.* 2008; 43(1): 126-134.
15. **Gouveia CH, Christoffolete MA, Zaitune CR, Dora JM, Harney JW, Maia AL, et al.** Type 2 iodothyronine selenodeiodinase is expressed throughout the mouse skeleton and in the MC3T3-E1 mouse osteoblastic cell line during differentiation. *Endocrinology.* 2005; 146(1): 195-200.

16. **Silva JE, Larsen PR.** Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J Clin Invest.* 1985; 76(6): 2296-2305.
17. **Skarulis MC, Celi FS, Mueller E, Zemska M, Malek R, Hugendubler L, et al.** Thyroid hormone induced brown adipose tissue and amelioration of diabetes in a patient with extreme insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(1): 256-262.
18. **Kaplan MM, Yaskoski KA.** Phenolic and tyrosyl ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. *J Clin Invest.* 1980;66(3):551-562.
19. **Roti E, Fang SL, Green K, Emerson CH, Braverman LE.** Human placenta is an active site of thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine tyrosyl ring deiodination. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981; 53(3): 498-501.
20. **Baqui M, Botero D, Gereben B, Curcio C, Harney JW, Salvatore D, et al.** Human type 3 iodothyronine seleno-deiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *J Biol Chem.* 2003; 278(2): 1206-1211.
21. **Bates JM, St Germain DL, Galton VA.** Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology.* 1999; 140(2): 844-851.
22. **Galton VA, Martinez E, Hernandez A, St Germain EA, Bates JM, St Germain DL.** Pregnant rat uterus expresses high levels of the type 3 iodothyronine deiodinase. *J Clin Invest.* 1999; 103(7): 979-987.
23. **Medina MC, Molina J, Gadea Y, Fachado A, Murillo M, Simovic G, et al.** The thyroid hormone-inactivating type III deiodinase is expressed in mouse and human beta-cells and its targeted inactivation impairs insulin secretion. *Endocrinology.* 2011; 152(10): 3717-3727.
24. **Schoenmakers CH, Pigmans IG, Poland A, Visser TJ.** Impairment of the selenoenzyme type I iodothyronine deiodinase in C3H/He mice. *Endocrinology.* 1993; 132(1): 357-361.
25. **Franca MM, German A, Gustavo FW, Liao XH, Bianco AC, Refetoff S, et al.** Human type 1 Iodothyronine deiodinase (DIO1) mutations cause abnormal thyroid hormone metabolism. *Thyroid.* 2020. Sep 29. doi: 10.1089/thy.2020.0253. Online ahead of print.
26. **Schneider MJ, Fiering SN, Pallud SE, Parlow AF, St Germain DL, Galton VA.** Targeted disruption of the type 2 seleno-deiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Mol Endocrinol.* 2001; 15(12): 2137-2148.
27. **Liao XH, Di Cosmo C, Dumitrescu AM, Hernandez A, Van Sande J, St Germain DL, et al.** Distinct roles of deiodinases on the phenotype of Mct8 defect: a comparison of eight different mouse genotypes. *Endocrinology.* 2011; 152(3): 1180-1191.
28. **Hernandez A, Martinez ME, Fiering S, Galton VA, St Germain D.** Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J Clin Invest.* 2006; 116(2): 476-484.
29. **Hernandez A, Martinez ME, Liao XH, Van Sande J, Refetoff S, Galton VA, et al.** Type 3 deiodinase deficiency results in functional abnormalities at multiple levels of the thyroid axis. *Endocrinology.* 2007; 148(12): 5680-5687.
30. **Hernandez A, Fiering S, Martinez E, Galton VA, St Germain D.** The gene locus encoding iodothyronine deiodinase type 3 (Dio3) is imprinted in the fetus and expresses antisense transcripts. *Endocrinology.* 2002; 143(11): 4483-4486.
31. **Dumitrescu AM, Liao XH, Abdullah MS, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, et al.** Mutations in SE-CISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat Genet.* 2005; 37(11): 1247-1252.
32. **Schoenmakers E, Agostini M, Mitchell C, Schoenmakers N, Papp L, Rajanayagam O, et al.** Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J Clin Invest.* 2010; 120(12): 4220-4235.
33. **Fu J, Fujisawa H, Follman B, Liao XH, Dumitrescu AM.** Thyroid Hormone Metabolism Defects in a Mouse Model of SBP2 Deficiency. *Endocrinology.* 2017; 158(12): 4317-4330.
34. **Fujisawa H, Korwutthikulrangsri M, Fu J, Liao XH, Dumitrescu AM.** Role of the Thyroid Gland in Expression of the Thyroid Phenotype of Sbp2-Deficient Mice. *Endocrinology.* 2020; 161(5).
35. **Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dungan K, et al.** *Endotext.* 2000.
36. **Huang SA, Tu HM, Harney JW, Venihaki M, Butte AJ, Kozakewich HP, et al.** Severe hypothyroidism caused by type 3 iodothyronine deiodinase in infantile hemangiomas. *N Engl J Med.* 2000; 343(3): 185-189.
37. **Luongo C, Trivisano L, Alfano F, Salvatore D.** Type 3 deiodinase and consumptive hypothyroidism: a common mechanism for a rare disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:115.
38. **Kappers MH, van Esch JH, Smedts FM, de Krijger RR, Eechoute K, Mathijssen RH, et al.** Sunitinib-induced hypothyroidism is due to induction of type 3 deiodinase activity and thyroidal capillary regression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(10): 3087-3094.

Address for correspondence:

Samuel Refetoff

University of Chicago, MC3090
5841 South Maryland Avenue
Chicago, IL 6067, USA
Tel: (1-773) 702-6939
e-mail: refetoff@uchicago.edu

„Зад маската“ на тиреотоксикозата – две фамилии със синдром на Рефетов (синдром на резистентност към тиреоидните хормони)

Христов, Кирил Х.¹, Хосамелдин, Мажед², Иванова, Ива В.¹, Димитрова, Рагина С.¹, Сидерова, Мира В.¹, Бояджиева, Мила Б.¹, Рефетов, Самуил^{2,3}

¹ Клиника по Ендокринология, Университетска болница „Св. Марина“, Медицински Университет, Варна

² Катедра по Медицина,

³ Катедра по педиатрия и Комисия по генетика, Чикагски университет

Адрес за кореспонденция:

Проф. д-р Кирил Христов Христов, дм
Клиника по Ендокринология,
УМБАЛ „Св. Марина“, Варна
Бул. „Хр. Смирненски“ 1, 9010 Варна
e-mail: k.hristozov@abv.bg

Постъпване: 07. 10. 2020

Приемане: 16. 10. 2020

Резюме

През 1967 г. Рефетов и сътрудници описват появата на фамилен синдром при две от шест деца родени от кръвнородствен брак (1). Наблюдаваното съчетание на глухонемота, хондродисплазия, гуша и абнормно високи нива на тиреоидни хормони (ТХ) е било на фона на еуметаболитно състояние. Като възможна хипотеза авторите предполагат съществуването на таргетна органна резистентност към действието на ТХ или инхибиране на тъканния им транспорт. От тогава и до момента продължава изясняването на причините за нарушенията, обединени под названието „Синдроми на нарушена чувствителност към тиреоидните хормони“. Характерната хормонална констелация от високи нива на серумни ТХ при недостатъчно супресирани тиреостимулиращ хормон (ТSH), може да заблуди клинициста и да доведе до неправилна терапевтична намеса и по-нататъшно загълбочаване на наличните нарушения. Представяме два клинични случая на пациенти с неразпознат синдром на Рефетов, скрит зад маската на тиреотоксикоза.

Ключови думи: синдром на Рефетов, тиреотоксикоза, тъканен хипотиреоидизъм,

Въведение

Два гена кодират двете главни изоформи на рецепторите на тиреоидните хормони (TR), които играят ролята на транскрипционни фактори. Мутации в тези гени (*THRA*, *THRB*) обуславят развитието на синдроми на резистентност към тиреоидните хормони (RTH, съответно α и β) с вариабилни фенотипни изяви в зависимост от засегнатите изоформи (2). Хетерогенността на

клиничните прояви е заложена в тъканно-специфичната експресия на двата главни гена на *THR*. За първия ген са описани два сплайс варианта. Тиреоидният рецептор алфа 1 (TR α 1) е застъпен основно в клетките на сърцето, костите, мозъка и скелетните мускули. Тиреоидният рецептор алфа 2 (TR α 2) не се свързва с тиреоидните хормони, затова и функцията му е неизвестна към момента. Двете форми на TR β се транскрибират от алтернативни начални позиции. Тиреоидният

рецептор бета 1 (TR β 1) се намира предимно в черния дроб и бъбреците, а тиреоидният рецептор бета 2 (TR β 2) – в хипофизата, ретината и кохлеата. Към биологично активния трийодтиронин (T₃) TR α 1, TR β 1 и TR β 2 имат сходен афинитет. Тиреоидните рецептори са съставени от няколко „модула“ с важно функционално значение. Общ за всички е ДНК-свързващият домейн, включващ два цинк-свързани модула, т.н. „цинкови пръсти“ (zinc fingers). Чрез вариабилен „шарнирен“ (hinge) участък, ДНК-свързващият домейн се свързва с C-терминален лиганд-свързващ домейн (3,4). Последният съдържа специфичен участък, към който се прикрепят две молекули T₃ (хомодимер), или T₃ заедно с друг член на суперфамилията ядрени рецептори, а именно ретиноидните X-рецептори, формирайки хетеродимер. Специфичните ДНК-секвенции, наречени „отговарящи на тиреоидните хормони елементи“ (TREs) се намират в промоторните региони на таргетните гени и към тях се свързват тиреоидните рецептори. Свързването към ДНК не изисква присъствието на T₃, но в случаите, когато T₃ липсва, вместо да иницирират транскрипцията на таргетните гени, TR се свързват с ко-репресори и потискат този процес. Свързването с T₃ отстранява ко-репресора, набира ко-активатори, които „отварят“ ДНК за транскрипция.

Синдромът на резистентност към тиреоидния рецептор бета (RTH β) има автозомно-доминантно унаследяване (в 80% от случаите), но може да възниква и спорадично чрез *de novo* мутации (20%). Честота му възлиза на 1 на 50 000 живородени (5). До момента са описани над 219 различни мутации на TR β при повече от 665 фамилии (6). Най-често болните са хетерозиготи. Имат един нормален алел (WT, *div* тип) и един мутантен алел (MUT). Продуктът на мутантния алел е дефектен TR β с доминиращо негативен ефект като интерферира транскрипционните свойства на WTTR, кодиран от нормалния алел. Нуклеотидните замени обуславят единични аминокиселинни промени в лиганд-свързващия домейн на TR. Това възпрепятства или понижава афинитета за свързването към T₃, но като цяло не променя способността за свързване на мутантните рецептори към специфичните ДНК секвенции. Така „доминантно-негативният ефект“ на мутантните рецептори понижава цялостно транскрипционната активност в таргетните гени. В резултат на това възниква тъканен хипотиреозизъм при липса на намалена продукция на тиреоидни хормони (ТХ). Клиничното подозрение рядко възниква при неонаталния скрининг за тиреоидна дисфункция, тъй като при повечето програми се изследва TSH.

Наличието на тахикардия, синдроми с дефицит на вниманието и хиперактивност, увеличаването размерите на щитовидната жлеза, обичайно насочват клинициста към функционално изследване на щитовидната жлеза. Съчетанието на компенсаторно повишени нива на ТХ с не потиснат тиреостимулиращ хормон (TSH) са основание да се заподозре RTH β . Белезите на хипертиреозизъм (тахикардия в покой и хиперактивност), както и позитивна фамилна анамнеза, изискват детайлно изследване и внимателна интерпретация. Тежестта и фенотипната изява при RTH β могат да варират сред засегнатите индивиди, дори и при носителство на една и съща мутация.

Диференциално-диагностичният алгоритъм изисква изключване на състояния със сходни клинични и хормонални промени като:

1) повишено ниво на тироксин-свързващ глобулин, 2) фамилна дисалбуминемична хипертироксинемия, 3) присъствие на антитела срещу TSH или тетрайодтиронина (T₄).

Други преходни състояния като тежко системно заболяване, остри психози, приложение на йод под формата на интравенозни контрастни вещества, амиодарон и бета блокери, повлияващи периферната конверсия на T₄ в T₃, също могат да наподобяват хормоналната констелация, наблюдавана при синдрома на RTH β . Не на последно място, макар и рядко срещано заболяване, е хипофизарният TSH-продуциращ тумор (Табл. 1).

Клиничен случай 1

Представяме пациентка на 25 годишна възраст, при която през юни 2012 г. по повод оплаквания от сърцебиене, епизоди на ширен дискомфорт и видимо увеличена щитовидна жлеза, са проведени хормонални изследвания. Установени са супресирани TSH при значимо завишени нива на свободните фракции на периферните ТХ (FT₃ и FT₄), което предполага тиреотоксикоза с аутоимунен произход, по-късно потвърдена от наличието на позитивни тиреотропин рецепторни (TRAK) и тиреопероксидазни антитела (TPO Abs) (Табл. 2).

Назначено е тиреостатично лечение в съчетание с бета-блокери. През ноември 2012 г. е регистрирана първата и единствена до момента бременност при пациентката, завършила с раждане на термин на доносен плод от мъжки пол. В периода на бременността не е провеждана тиреостатична терапия. Регистрирани са, обаче, леко повишени нива на TPO Abs и TRAK. Поради персистиращи оплаквания от сърцебиене и повишено нервно напрежение след раждането е възобновена тиреостатичната терапия.

Таблица 1. Сравнение на клиничните находки и лабораторни резултати при TSH-секретиращите питуитарни аденоми и при резистентност към тиреоидните хормони (RTH). (Адаптирано по Tjörnstrand A., Nyström H.F. Diagnostic Approach to TSH-producing Pituitary Adenoma, *Europ J Endocrinol*, 2017; 4: p R183-R197.)

Параметри	TSH-продуциращ аденом	Резистентност към тиреоидните хормони (RTH)
Гуша	94%	80%
Хиперсекреция/дефицит на гръдни хипофизарни хормони	Да	Не
Повишен SHBG и/или ICTP	90%	8%
Повишено ниво на α -субединица	Да	Не
Повишаване на TSH след стимулация с TRH	Да	Не
Повишаване на α -субединицата след стимулация с TRH	Да	Не
Лезия на хипофиза (ЯМР/КАТ)	99%	23%
Периметрия	Възможни отклонения	Норма
Отговор на TSH към T_3 супресионен тест	Негативен	Частичен
ДНК мутационен анализ	Отрицателен	Положителен
Соматостатинов тест	Спаг на FT_4 >30%	FT_4 не се променя

Таблица 2. Лабораторни изследвания и провеждано лечение – клиничен случай 1.

Дата мес./год	TSH μ IU/ml (0,4-4)	FT_4 pmol/l (10,6-21)	FT_3 pmol/l (2,8-6,5)	ЛЕЧЕНИЕ	TPO n. <35 U/ml Tg Ab n. <40 U/ml TRAK n. <1,75 IU/l TSI <0,55 IU/l
06.2012	0,017			ММИ 3x2m; пропранолол	
07.2012	0,024	89,6	20,5		
11.2012	4,21	23,9	7,1	Бременност; без лечение	
01.2013	1,98		6,4	Бременност; без лечение	TPO Ab 50,77; TRAK 16 (<30)
06.2013				Раждане →ММИ	
10.2015	3,85		5,5	ММИ 2x 1/2 16	TPO Ab 120; TRAK 16 (<30)
02.2016	14,8	23,4		ММИ 2t →субтотална тиреоидектомия	
след 10 гена	116	16,1	3,3	LT4 75 mkg	
05.2016	69,9			LT4 100 mkg	TPO 196
09.2016	21,4		6,2	LT4 125 mkg	
01.2017	26,7	36,1		LT4 125/150 mkg	
03.2017	17,1	28,3	5,6	LT4 125 mkg	
03.2017	15,2	26,9	5,3	LT4 125 mkg	TPO Ab 70,7; Tg Ab <20
01.2018	14,5	30,8	4,5	LT4 100/125 mkg; β -блоккер	TSI 0,23

FT_3 – свободен T_3 ; FT_4 – свободен T_4 ; Tg Ab – тиреоглобулинови антитела;
TPO Ab – тиреопероксидазни антитела; TRAK – TSH-рецепторни антитела;
TSI – тиреостимулиращ имуноглобулин; ММИ – метилмеркаптоимидазол.

През февруари 2016 г. е извършена субтотална резекция на щитовидната жлеза. Хистологичният резултат описва „нодозна струма с базедофикация“. Около 10 дни по-късно пациентката е хоспитализирана по спешност по повод хипокалциемична криза и данни за постоперативен хипопаратиреоидизъм (Табл. 2).

За първи път пациентката постъпва в клиниката през март 2017 г. на фона на терапия с левотироксин 125 мкг дневно. Хормоналните изследвания потвърждават наличието на несъответна секреция на TSH. От проведеното ехографско изследване на шийна област се установяват двустранно хетерогенни тиреоидни остатъци с повишен доплеров кръвоток (Фиг. 1).

Допълнителните биохимични изследвания не показват повишен тъканен отговор към ТХ (SHBG 33,8 пмо/л, референтни граници 18-144). От проведеня ядрено-магнитен резонанс (ЯМР) на глава не се установяват промени в областта на хипофизата. Дозата левотироксин е увеличена до 137 мкг дневно.

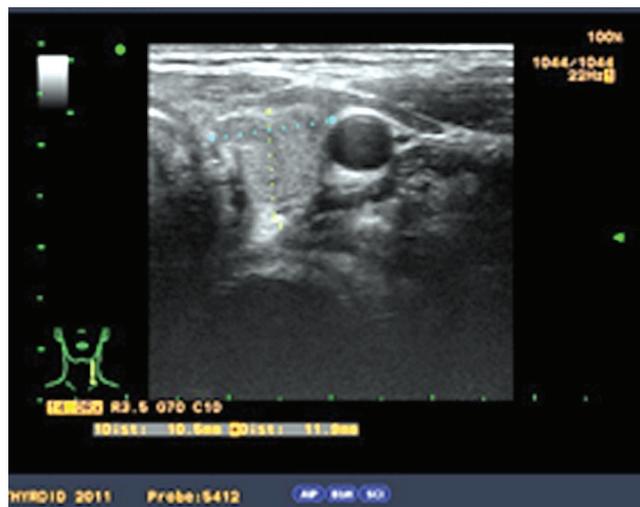
Извършеният скрининг на родствениците от първа линия установява сходна хормонална конституция при бащата (TSH 4,48 μ U/ml; FT₄ 37,4

pmol/l) и сина (TSH 2,44 μ U/ml; FT₄ 22,4 pmol/l) на пациентката, което се потвърждава при повторено изследване (Фиг. 2).

Проведеният генетичен анализ разкрива наличието на missense мутация при пробанда (II -1, Фиг. 2B) и баща ѝ (I-2), засягаща екзон 7 на *THRB* гена. Тази мутация води до замяна на гуанин с аденин, с което се заменя намиращият се нормално на позиция 243 аргинин с глутамин (R243Q, Фиг. 2B). Синът (III-1) и майката (I-1) на пробанда имат нормални фенотип и генотип.

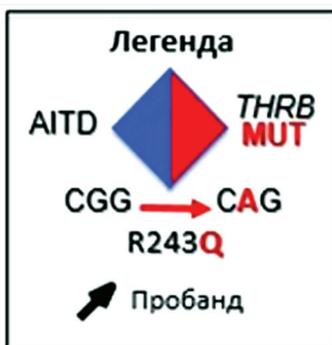
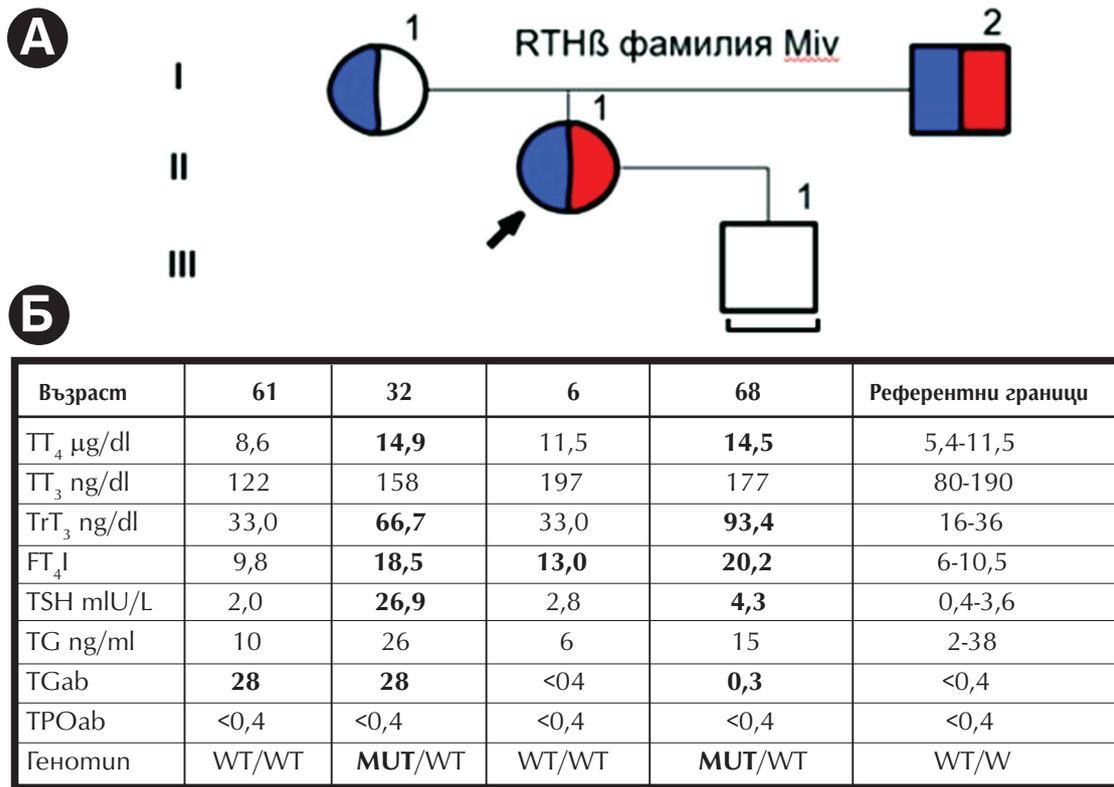
Тази мутация е описана досега при 27 неродствени фамилии (лично наблюдение - С. Рефетов). Засяга шарнирния участък на *THRB* и намалява свързването му с Т3, само когато рецепторът е прикрепен към ДНК (7). При пациентката и нейната майка има данни и за наличие на автоимунно тиреоидно заболяване (AT₃) с положителен титър на тиреоидните антитела (Фиг. 2B). В литературата често се среща съчетанието на *RTHB* с AT₃ (8). Като предполагаем механизъм се сочи хроничната ТСХ стимулация, която активира интра-тиреоидните лимфоцити, индуцирайки тиреоидна увреда и автоимунен хипотиреоидизъм (8). Тази хипотеза все още не е доказана.

Фигура 1. Ехография на щитовидна жлеза – клиничен случай 1.



Тиреоидни остатъци в ляво и дясно с лекостепенна нехомогенност на паренхима без възлести промени.

Фигура 2. Родословие на семейството (Miv) от първия случай и резултати от тиреоидните функционални тестове и генетичен анализ.



Пробандът (II-1) е с хипопаратиреоидизъм след тиреоидектомия и към датата на изследването е приемал 137 µg левотироксин дневно.

(А) Родословието с поколения, обозначени с римски цифри и индивиди с арабски цифри.

AITD – аутоимунно заболяване на щитовидната жлеза, WT – див тип или често срещан тип, MUT – мутант.

(Б) Резултатите от тестовете за функция на щитовидната жлеза се поправяват с всеки символ, представляващ член на семейството. Абнормните стойности са подчертани в червено.

R7293 – майка на пробанда; R7232 – пробанд; R7294 – син на пробанда; R7294 – баща на пробанда (в червено са отбелязани патологичните резултати). ТТ₄ – общ Т₄, ТТ₃ – общ Т₃, ТrТ₃ – тотален обратен Т₃, FT₄I – индекс свободен Т₄, TSH – тиреоид-стимулиращ хормон, TG – тиреоглобулин, TGab – тиреоглобулинови антитела, TPOab – тиреопероксидазни антитела.

(В) Електроферограми на част от THRB гена (екзон 7 обратна структура), показващи хетерозиготна мутация (виж легендата) при субекти I-2 и II-1.

Клиничен случай 2

Представяме пациентка на 58 годишна възраст, при която през 2010 г. е поставена диагноза тиреотоксикоза по повод на оплаквания от повишена емоционална лабилност, епизоди на сърцебиене, повишена потливост. При ехографски данни за ногозна струма са установени повишени нива на FT₄ с несупресирани TSH и е започната терапия с пропицил (ПТУ) и пропранолол.

При проследяването на фона на ПТУ се потвърждават повишени нива на TSH при нормален серумен FT₄ и завишен FT₃. (Табл. 4).

През януари 2012 г. при проведената сцинтиграфия на щитовидна жлеза с 2mCi 99mTc-пертехнетат се установяват данни за интензивно и хомогенно натрупване на радионуклида, като не се скенират функционално отграничени възли. (Фиг. 3а).

До април 2014 г. пациентката остава на тиреостатично лечение. Въз основа на данните за възлести промени в паренхима на щитовидната жлеза и след проведена тънкоиглена аспирационна биопсия на хиперехогенен възел от ляв дял на жлезата, която е с бенигнен резултат, е взето решение за оперативно лечение в обем истмектомия, левостранна лобектомия и парциална

резекция на десен дял. След извършената септември 2014 г. тиреоидна резекция тиреостатичната терапия е преустановена.

Постоперативно пациентката е с персистиращи тиреотоксични оплаквания на фона на повишени нива на периферните ТХ и несупресирани ТСХ, поради което отново е включена терапията с тиреостатик. Ехографското проследяване установява наличие на тиреоидни остатъци с възлести промени. (Фиг. 3 б,в)

Поради съмнение за TSH-секретиращ тумор е проведен ЯМР на глава, който установява лезия в хипофизата с размери 2,5мм (предно-заден)/4мм (кранио-каудален)/6,3мм (медио-латерален) с вид на микроаденом (Фиг. 4).

Допълнителните биохимични изследвания не показват повишен тъканен отговор към ТХ (SHBG 49,9 пмо/л; референтни граници 18-144). Извършеният скрининг при роднините установява несъответна секреция на TSH при гъщерята на пациентката (TSH 0,92 uIU/ml, FT₄ 29,2 рмо/л, FT₃ 6,26 рмо/л), а проведенният ЯМР не установява промени в областта на хипофизната жлеза.

От проведените генетични изследвания на пробанда (I-1) и нейната гъщеря (II-1) се установява мутация на THRβ (Фиг. 5Б). Установената мутация на TRNB гена отново засяга екзон 7, където

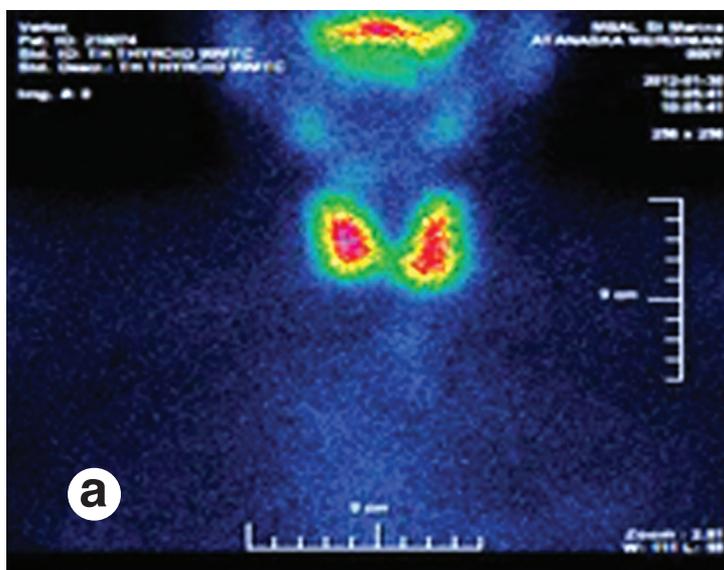
Таблица 3. Лабораторни изследвания и провеждано лечение – клиничен случай 2.

Дата мес./гог.	TSH μIU/ml (0,4-4)	FT ₄ pmol/l (10,6-21)	FT ₃ pmol/l (2,8-6,5)	ЛЕЧЕНИЕ	TPO n. <35 U/ml Tg Ab n. <40 U/ml TRAK n. <1,75 IU/l TSI <0,55 IU/l
10. 2010	1,43	27,2		ПТУ 4г Пропранолол 20mg	TPO 31; TRAK 0,994
11. 2010	4,1	28,3	8,5		
12. 2011	1,42	33,2	10,5		TRAK 1,93
05. 2012	2,32	26,5		ММИ 2м.	
11. 2013	20,1	21	7,1	ММИ 2м. Пропранолол 20mg	
02. 2014		10,5	7,6	ММИ 2м. Пропранолол 10mg	TRAK 2,13
04. 2014	25,3	12,7	6,6		
09. 2014				Парциална тиреоидектомия	
11. 2014	3,02	33,8	8,2	ММИ 1м.	
07. 2018	6,28	29,7	8,0		TSI <0,1
08. 2018	24,3	15,8	6,5	ММИ 4м. Пропранолол 20mg	TPO Ab <10; Tg Ab <20
09. 2018	100	3,2	2,8	β-блоклер	
10. 2018	9,3	22,1	8,1		
03. 2019	4,43	22	6,7	Пропранолол 40mg/гн	

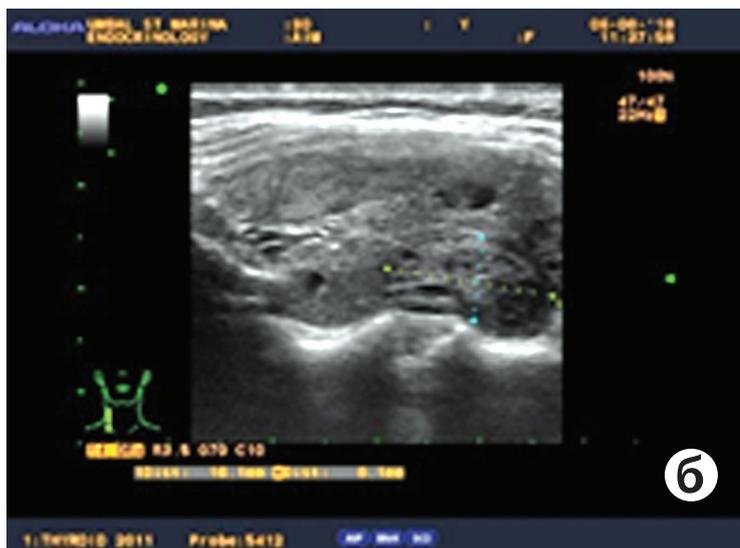
FT₃ – свободен T₃; FT₄ – свободен T₄; Tg Ab – тиреоглобулинови антитела; TPO Ab – тиреопероксидазни антитела; TRAK – TSH-рецепторни антитела; TSI – тиреостимулиращ имуноглобулин; ММИ – метилмеркаптоимидазол; ПТУ – пропилтиоурацил.

то замяната на гуанин с аденин води до замяна на нормално намиращият се на позиция 234 аланин с треонин (A234T). Мутантният рецептор притежава 35% от активността на нормалния (WT) рецептор. Описаната мутация е изолирана при 11 групи фамилии и засяга шарнирния участък на TR β (лично наблюдение - С. Рефетов). Предвид доказаната мутация при пробанда приемаме, че описаният микроаденом на хипофиза е вероятно инциденталом.

Фигура 3.



3) а Сцинтиграфия на щитовидна жлеза – клиничен случай 2 (2012 г.);



3) б,в Ехография на ляв и десен тиреоиден остатък.





Фигура 4.

Ядрено-магнитен резонанс на хипофиза – клиничен случай 2.

Микроаденом в турското седло с размери 2,5/4,0/6,3 мм.

Заклучение

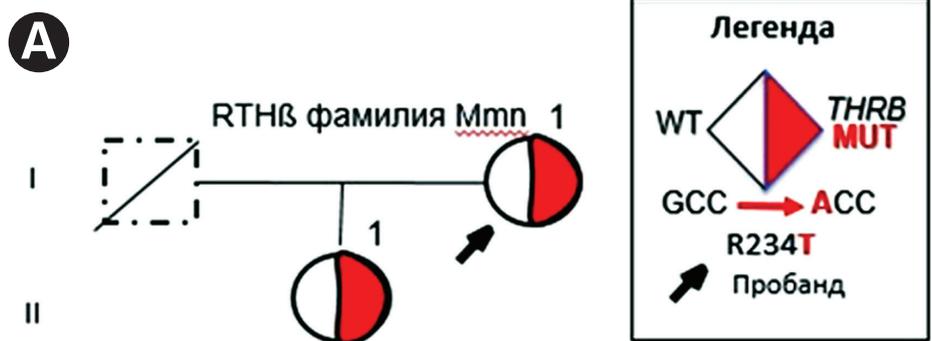
При повечето пациенти, синдромът на RTHβ изглежда успешно се компенсира от повишената ендогенна продукция на ТХ, като в повечето случаи индивидите са клинично еутиреоидни. Неразпознаването на симптомите и белезите на тези синдроми при някои пациенти води до нежелано редуциране на паренхима на щитовидната жлеза (радиоiodтерапия, резекция в различен обем) или ненужен прием на тиреостатици. Подобни терапевтични решения засилват признаците на тъканен хипотиреоидизъм в резистентните тъкани и отново създават дисбаланс между временно нормализираните стойности на Т₄ и клиничната картина.

Заместителната терапия с левотироксин след парциална или пълна тиреоидна аблация следва да се титрира като за таргет биха могли да се използват изходните нива на ТSH, FT₄ и FT₃, а също така и успоредното проследяване на параметрите, свързани с тъканното действие на ТХ – SHBG, холестерол, остеокалцин, карбокситерминален телопептид, феритин и креатинкиназа (6).

Благодарности: Разработката ни е подкрепена отчасти с безвъзмездна помощ DK15070 от Националния здравен институт (САЩ).

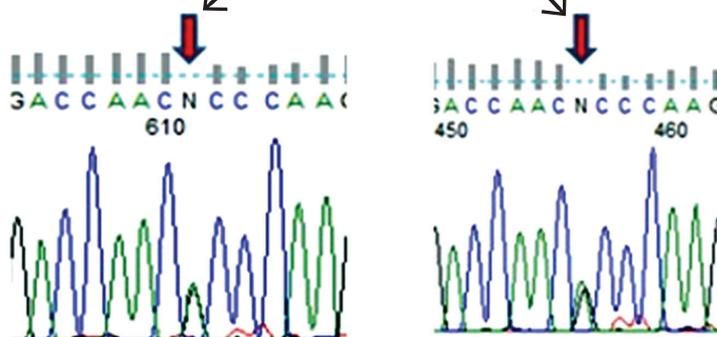
Фигура 5.

Родословие на семейството (Mmn) от втория случай и резултати от функционалните тиреоидни изследвания и генетичен анализ.



Б

Възраст	39	66	Референтни граници
ТТ ₄ µg/dl	13,2	14,5	5,4-11,5
ТТ ₃ ng/dl	140	185	80-190
ТrТ ₃ ng/dl	76,1	53,1	16-36
FT ₄ I	17,2	18,4	6-10,5
TSH mIU/L	1,7	4,9	0,4-3,6
TG ng/ml	39	160	2-38
TGab	<0,4	<0,4	<0,4
TPOab	<0,4	<0,4	<0,4
Генотип	WT/MUT	WT/MUT	WT/W

Б

Пробандът (I-1) е претърпял пет години по-рано частична тиреоидектомия.

(А) Родословието с генерации, обозначени с римски цифри а отделните индивиди – с арабски цифри. WT-див тип или обикновен тип, MUT-мутант.

(Б) Резултатите от тестовете за функция на щитовидната жлеза се поправяват с всеки символ, представляващ член на семейството. Необичайните стойности са подчертани в червено. ТТ₄ - общ Т₄, ТТ₃ - общ Т₃, ТrТ₃ - общ обратен Т₃, FT₄I - индекс свободен Т₄, TSH - тиреостимулиращ хормон, TG - тиреоглобулин, TGab - тиреоглобулинови антитела, TPOab - тиреопероксидазни антитела.

(В) Електроферограми на част от гена THRβ (секвенция от екзон 7), показващи хетерозиготна мутация (виж легендата) при субекти I-1 и II-1.

„Behind the Mask“ of Thyrotoxicosis – Two Families with Refetoff Syndrome (*syndrome of resistance to thyroid hormones*)

Hristozov, Kiril H.¹, Hossameldin, Maged², Ivanova, Iva V.¹, Dimitrova, Radina S.¹, Siderova, Mira V.¹, Boyadzieva, Mila B.¹, Refetoff, Samuel^{2,3}.

¹Clinic of Endocrinology, University Hospital „St. Marina“, Medical University of Varna

²Department of Medicine, ³Department of Pediatrics and Genetic Committee, The University of Chicago

Address for correspondence:

Kiril Hristov Hristozov, MD, PhD
University Hospital „St. Marina“, Varna
9010 Varna, bul. Hr. Smirnenski 1
e-mail: k.hristozov@abv.bg

Submitted: 07. 10. 2020

Accepted: 16. 10. 2020

Abstract

In 1967 Refetoff et al. described the occurrence of a familial syndrome in two of six children born to a consanguineous marriage (1). The combination of deaf-mutism, chondrodysplasia, goiter and abnormally high levels of thyroid hormones (TH) was observed in the background of a eumetabolic condition. As a possible hypothesis, the authors suggested the existence of target organ resistance to the effect of TH or inhibition of their tissue transport. Since then, the causes of the disorders collectively termed „Syndromes of impaired sensitivity to thyroid hormone“, continue to be investigated. The characteristic hormonal constellation of high levels of the serum TH with insufficiently suppressed thyroid stimulating hormone (TSH) may mislead the clinician and lead to incorrect therapeutic intervention and further deterioration of the existing disturbances.

We present two clinical cases of patients with unrecognized Refetoff syndrome hidden behind the mask of thyrotoxicosis.

Key words: Refetoff syndrome, thyrotoxicosis, tissue hypothyroidism

Introduction

Two genes encode the two major isoforms of thyroid hormone receptors (TRs) which function as transcription factors. Mutations in these genes (*THRA*, *THRB*) cause the development of syndromes of resistance to thyroid hormones (RTH, α and β , respectively) with variable phenotypic manifestations depending on the affected receptor isoforms (2). The heterogeneity of clinical manifestations is embedded in the tissue-specific expression of the two major *THR* genes. Two splice variants have been described regarding the first gene.

Thyroid hormone receptor alpha 1 (TR α 1) is present mainly in heart, bones, brain and skeletal muscles. The TR α 2 does not bind the thyroid hormone (TH) ligand and thus its physiological function is unknown. The

two forms of the TR β are generated by alternative transcription start sites. TR β 1 is found mainly in the liver and kidneys, whereas TR β 2 is localized in the pituitary gland, retina and cochlea. TR α 1, TR β 1 and TR β 2 have a similar affinity for the biologically active triiodothyronine (T₃). TRs are composed of several „modules“ with functional importance. Common to all is the DNA-binding domain, including two zinc-linked modules, so-called „zinc fingers“. Through a hinge region, the DNA-binding domain binds to the C-terminal ligand-binding domain (3, 4). The latter contains the hormone binding that binds two molecules of T₃ (homodimer) or a T₃ with another member of the nuclear receptor superfamily, namely, retinoid X-receptors, forming a heterodimer. The C-terminal domain also contains the dimerization domain. TRs bind to specific DNA sequences

known as TH response elements (TREs) located in the promoter regions of target genes. DNA binding does not require the presence of T_3 , however in its absence, TRs recruit co-repressors that suppress the transcription of genes positively regulated by TH. T_3 binding, removes the corepressor and recruits co-activators that open the DNA for transcription.

The syndrome of resistance to thyroid hormone beta (RTH β) has an autosomal dominant inheritance (80% of cases), but can also occur sporadically by de novo mutations (20%). Its frequency accounts to 1 in 50 000 live births (5). To date, more than 219 different THR β mutations have been described in more than 665 families (6). Most often the patients are heterozygous. They have one normal allele (WT, wild type) and one mutant allele (MUT). The product of the mutant allele is a defective TR β with a dominating negative effect by interfering with the transcription properties of the WTTR encoded by the normal allele. Nucleotide substitutions usually produce single amino acid changes in the ligand-binding domain of TR. This inhibits or decreases the affinity for binding to T_3 , but generally does not alter the ability of mutant receptor to bind to specific DNA sequences, thus, exerting a dominant negative effect. As a result, tissue hypothyroidism occurs in the absence of reduced production of TH. Clinical suspicion rarely arises within the neonatal screening because most programs are based on TSH measurement, which is normal. Tachycardia, attention deficit disorder with hyperactivity and goiter on physical examination are the most common reasons for obtaining thyroid function tests. The combination of elevated levels of TH with unsuppressed TSH are reasons to suspect RTH β . Signs of hyperthyroidism (resting tachycardia and hyperactivity) and positive family history require detailed assessment and careful interpretation. The severity and phenotypic expression of RTH β may vary among the affected individuals, even when carrying the same mutation. The differential diagnostic algorithm requires the exclusion of conditions with similar hormonal changes, such as:

- 1) increased levels of thyroxin-binding globulin;
- 2) familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia;
- 3) presence of antibodies against TSH or tetraiodothyronin (T_4).

Other transient conditions such as severe systemic disease, acute psychosis, iodine administration as intravenous contrast agents, amiodarone and beta-blockers, affecting the peripheral conversion of T_4 to T_3 may also mimic the hormonal constellation seen in RTH β syndrome. Last but not least, the rare pituitary TSH producing tumor should be taken into consideration (Table 1).

Clinical case 1

We present a 25-year-old female (in June 2012) complaining of palpitations, episodes of neck discomfort and a visibly enlarged thyroid gland who was referred

for thyroid hormonal testing. Suppressed TSH was found with significantly elevated peripheral TH levels suggesting thyrotoxicosis of autoimmune etiology, subsequently confirmed by the presence of TRAK and thyroperoxidase antibodies (TPO Abs) (Table 2).

Treatment with antithyroid medication was initiated in combination with a beta blocker. In November 2012 the patient was found to be pregnant delivering a full term male infant. No antithyroid drugs were administered during her pregnancy. Slightly elevated levels of TPO Abs as well as TSH receptor antibodies (TRAbs) were registered during the pregnancy. Due to persistent complaints of palpitations and increased nervousness after the delivery, antithyroid drug therapy was resumed.

In February 2016 a subtotal resection of the thyroid gland was performed. The histology described „nodular goiter with signs of hyperactivity“. About 10 days later, the patient was hospitalized on emergency for a hypocalcemia and evidence of postoperative hypoparathyroidism (Table 2).

The patient was admitted in our clinic for the first time in March 2017, taking levothyroxine 125 μ g daily. Her hormonal tests suggested inappropriate TSH secretion. Ultrasound examination of the neck revealed bilateral heterogeneous thyroid remnants with increased blood flow assessed with Doppler ultrasound (Fig. 1).

Additional biochemical assessment did not indicate increased response to TH in peripheral tissues (SHBG 33,8 nmo/l; reference range 18-144). A head MRI did not detect any lesions in the region of the pituitary gland. The dose of levothyroxine was increased to 137 μ g daily.

First-line relatives of the patient were screened and we discovered a similar hormonal constellation in her father (TSH 4,48 μ IU/ml; FT $_4$ 37,4 pmol/l) and her son (TSH 2,44 μ IU/ml; FT $_4$ 22,4 pmol/l), confirmed on repeated testing (Fig. 2B).

Genetic studies revealed the presence of a missense mutation in the proband (II-1, Fig. 2C) and her father (I-2), located in exon 7 of the *THRB* gene. This mutation results in the replacement of guanine with adenine, which leads to the replacement of the normal arginine-243 with glutamine (R243Q, Fig. 2C). The son (III-1) and the mother of the proband (I-1) had normal phenotype and genotype (Fig. 2).

This mutation has been described so far in 27 unrelated families (personal observations - S. Refetoff). It affects the hinge region of THR β and reduces its binding to T_3 only when the receptor is attached to DNA (7). The patient's mother and father also had evidence of an autoimmune thyroid disease (AITD) as evidenced by positive thyroid autoantibodies (Fig. 2B). Indeed, subjects with RTH β have a higher prevalence of AITD (8). It has been suggested but not proven that chronic TSH stimulation, which activates intrathyroid lymphocytes may induce thyroid damage and AITD.

Table 1. Comparison of clinical findings and laboratory results in TSH-secreting pituitary adenomas and resistance to thyroid hormones-beta (RTH β). (Adapted from Tjörnstrand A, Nyström HF. Diagnostic Approach to TSH-producing Pituitary Adenoma. *Europ J Endocrinol* 2017; 4: R183-R197.)

Parameters	TSH-producing adenoma	Resistance to thyroid hormones (RTH β)
Goiter	94%	80%
Hypersecretion/deficiency of other pituitary hormones	Yes	No
Increased SHBG and / or ICTP	90%	8%
Elevated level of α -subunit	Yes	No
Increase in TSH after stimulation with TRH	Yes	No
Increase in the α -subunit after stimulation with TRH	Yes	No
Pituitary lesion (MRI / CAT)	99%	23%
Visual field test	Possible deviations	Normal
TSH response to T ₃ suppression test	Negative	Partial
DNA mutation analysis	Negative	Positive
Somatostatin test	Decline of FT ₄ >30%	FT ₄ does not change

Table 2. Laboratory tests and treatment – clinical case 1.

Date MM.YY	TSH μ IU/ml (0,4-4)	FT ₄ pmol/l (10,6-21)	FT ₃ pmol/l (2,8-6,5)	Treatment	TPO n. <35 U/ml TRAK n. <1,75 IU/l	Tg Ab n. <40 U/ml TSI <0,55 IU/l
06.2012	0,017			MMI 3x2tb; propranolol		
07.2012	0,024	89,6	20,5			
11.2012	4,21	23,9	7,1	Pregnancy; no treatment		
01.2013	1,98		6,4	Pregnancy; no treatment	TPO Ab 50,77; TRAK 16 (<30)	
06.2013				delivery \rightarrow MMI		
10.2015	3,85		5,5	MMI 2x 1/2 tb	TPO Ab 120; TRAK 16 (<30)	
02.2016	14,8	23,4		MMI 2tb \rightarrow near total throidectomy		
after 10 days	116	16,1	3,3	LT ₄ 75 mkg		
05.2016	69,9			LT ₄ 100 mkg	TPO 196	
09.2016	21,4		6,2	LT ₄ 125 mkg		
01.2017	26,7	36,1		LT ₄ 125/150 mkg		
03.2017	17,1	28,3	5,6	LT ₄ 125 mkg		
03.2017	15,2	26,9	5,3	LT ₄ 125 mkg	TPO Ab 70,7; Tg Ab <20	
01.2018	14,5	30,8	4,5	LT ₄ 100/125 mkg; β -bloker		TSI 0,23

FT₃ – free T₃; FT₄ – free T₄, Tg Ab – thyroglobulin antibodies, TPO Ab – thyroperoxidase antibodies, TRAK – TSH receptor antibodies, TSI – thyroid stimulating immunoglobulin; MMI – methylmercaptoimidazole; LT₄ – levothyroxine.

Clinical case 2

A 58-year-old female presented with increased emotional lability, episodes of palpitation, increased sweating and was diagnosed to have thyrotoxicosis. Serum FT₄ was elevated but TSH was not suppressed. Ultrasound of the thyroid gland showed a nodular goiter and therapy with propylthiouracil (PTU) and propranolol was initiated.

Follow up of the patient confirmed the elevated TSH in the presence of normal serum FT₄ and elevated serum FT₃ levels while on PTU (Table 4).

A thyroid scintigraphy performed in January 2012 revealed intensive and homogeneous accumulation of the radionuclide (2mCi 99mTc-pertechnetate) without evidence of any functionally distinguishable or active nodules. (Fig. 3A).

The patient continued the antithyroid drugs until April 2014. Based on the ultrasound data of thyroid nodules, a fine-needle aspiration biopsy of a hyper-echoic nodule in the left lobe was performed (benign result) and a decision was made for thyroid surgery (isthmectomy, left lobectomy and partial resection of right thyroid lobe). After the operation (September 2014) the antithyroid drug treatment was discontinued.

Postoperatively, the patient had persistent thyrotoxic symptoms and elevated levels of serum TH with unsuppressed TSH and therefore the therapy with anti-

thyroid drug was resumed. The ultrasound examination revealed the presence of thyroid remnants with nodular changes (Fig. 3B, C).

Due to suspicion of a TSH-secreting tumor, a MRI of the head was performed and found a lesion in the pituitary gland measuring 2,5 mm (anterior-posterior diameter) to 4 mm (cranio-caudal) to 6,3 mm (medio-lateral diameter) with the appearance of a microadenoma (Fig. 4).

Additional biochemical assessment did not show an increased peripheral tissue response to TH (SHBG 49,9 nmo/l; reference range 18-144). Screening tests in relatives of the patient revealed unsuppressed TSH in the presence of high serum TH levels in her daughter (TSH 0,92 uIU/ml, FT₄ 29,16 pmol/l, FT₃ 6,26 pmol/l), without MRI changes in the pituitary area.

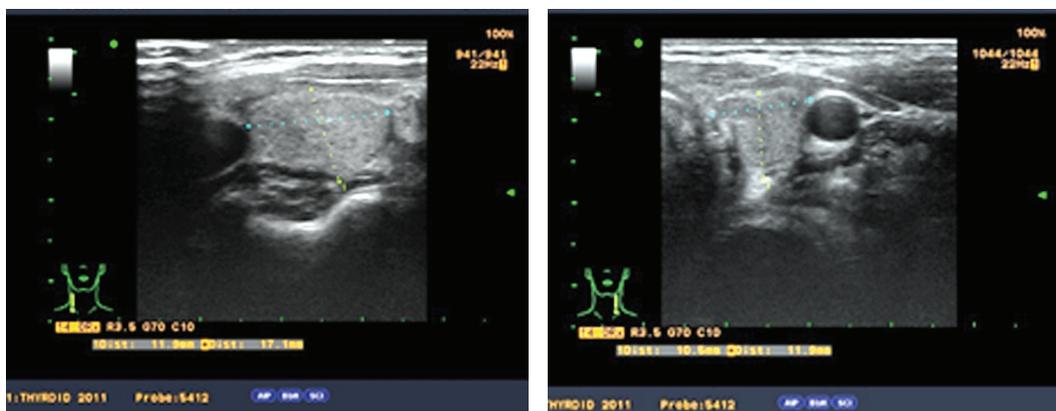
Genetic testing of the proband (I-1) and her daughter (II-1) disclosed a mutation of the THRB gene (Fig. 5C). The detected THRB gene mutation in this family was also located in exon 7 where the replacement of guanine with adenine leads in the replacement of the normal alanine-234 with threonine (A234T). The mutant receptor has 35% of the activity of the WT receptor. The described mutation has been identified in 11 other families (personal observations - S. Refetoff) and affects the hinge region of TRβ. Given the proven mutation in the proband, we assume that the concomitant pituitary microadenoma represents an incidentaloma.

Table 3. Laboratory tests and treatment – clinical case 2.

Date MM.YY	TSH μIU/ml (0,4-4)	FT ₄ pmol/l (10,6-21)	FT ₃ pmol/l (2,8-6,5)	Treatment	TPO n. <35 U/ml Tg Ab n. <40 U/ml TRAK n. <1,75 IU/l TSI <0,55 IU/l
10. 2010	1,43	27,2		PTU 4tb Propranolol 20mg	TPO 31; TRAK 0,994
11. 2010	4,1	28,3	8,5		
12. 2011	1,42	33,2	10,5		TRAK 1,93
05. 2012	2,32	26,5		MMI 2tb	
11. 2013	20,1	21	7,1	MMI 2tb Propranolol 20mg	
02. 2014		10,5	7,6	MMI 2tb Propranolol 10mg	TRAK 2,13
04. 2014	25,3	12,7	6,6		
09. 2014				Partial thyroidectomy	
11. 2014	3,02	33,8	8,2	MMI 1tb	
07. 2018	6,28	29,7	8,0		TSI <0,1
08. 2018	24,3	15,8	6,5	MMI 4tb Propranolol 20mg	TPO Ab <10; Tg Ab <20
09. 2018	100	3,2	2,8	β-bloker	
10. 2018	9,3	22,1	8,1		
03. 2019	4,43	22	6,7	Propranolol 40mg/daily	

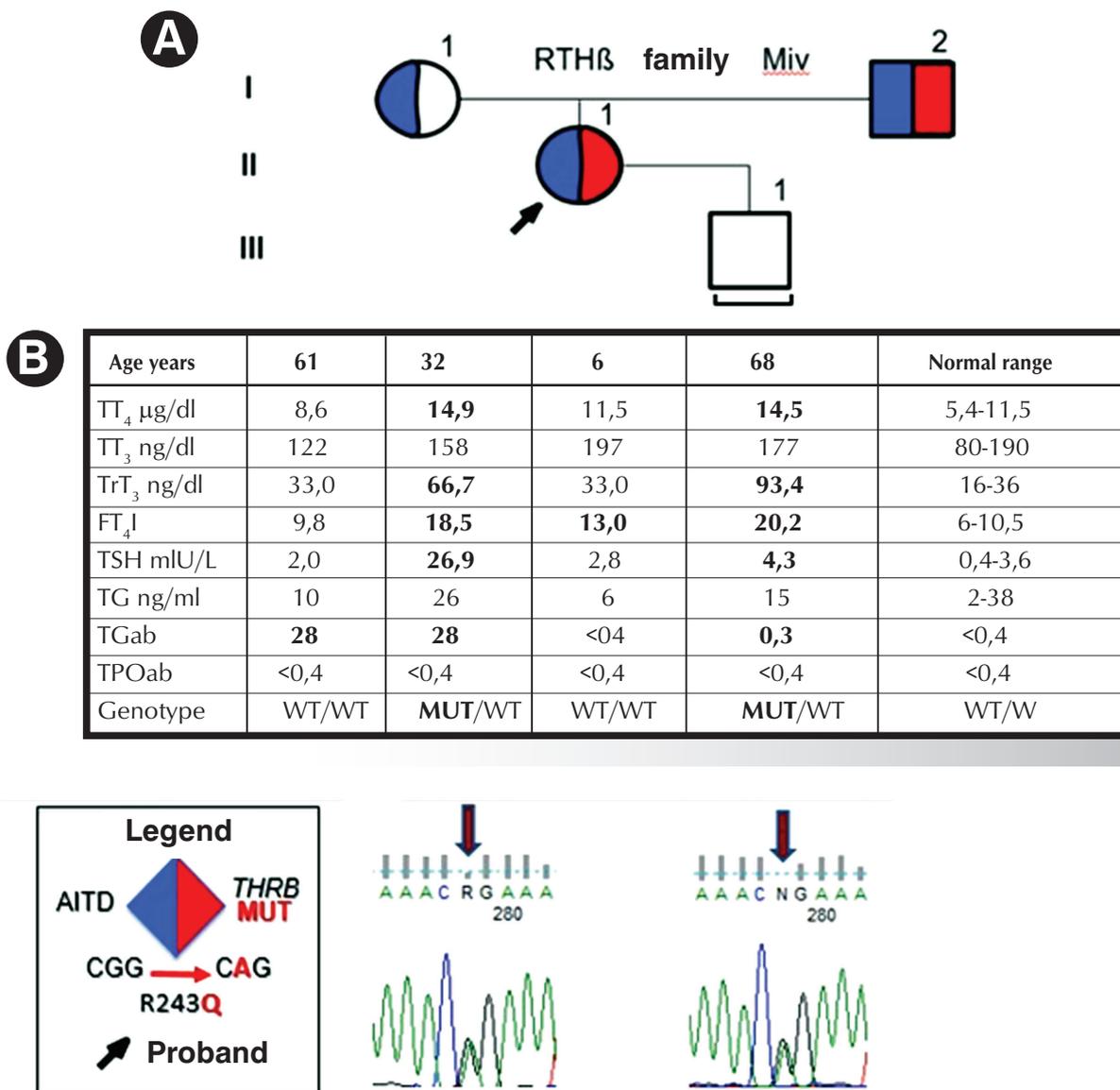
FT₃ – free T₃; FT₄ – free T₄; Tg Ab – thyroglobulin antibodies, TPO Ab – thyroperoxidase antibodies, TRAK – TSH receptor antibodies, TSI – thyroid stimulating immunoglobulin; MMI – methylmercaptoimidazole; PTU – propylthiouracil.

Figure 1. Ultrasound of the thyroid gland – clinical case 1



Thyroid remnants on the left and right with mild inhomogeneity of the parenchyma without nodular changes.

Figure 2. Pedigree of the family (Miv) of the first case and results of thyroid function tests and genetic analysis.



The proband (II-1) hypoparathyroidism following thyroidectomy and at the time of testing was on 137 µg/day of levothyroxine.

(A) The pedigree with generations indicated by Roman numerals and subjects by Arabic numbers. AITD- autoimmune thyroid disease, WT-wild-type or common type, MUT-mutant.

(B) Results of thyroid function tests are aligned with each symbol representing a member of the family. Abnormal values are in bold red numbers. TT₄- total T₄, TT₃- total T₃, TrT₃- total reverse T₃, FT₄I - free T₄ index, TSH - thyroid-stimulating hormone, TG - thyroglobulin, TGAb - thyroglobulin antibodies, TPOAb - thyroperoxidase antibodies.

(C) Electropherograms of a portion of *THRB* gene (exon 7 reverse sequence) showing a heterozygous mutation (see legend) in subjects I-2 and II-1.

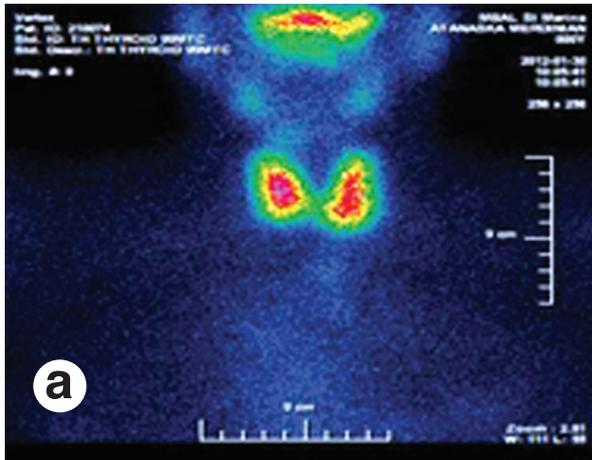


Figure 3.

3) a Thyroid scintigraphy- patient 2 (2012 yr.);



3) b,c Ultrasound of left and right thyroid remnant.

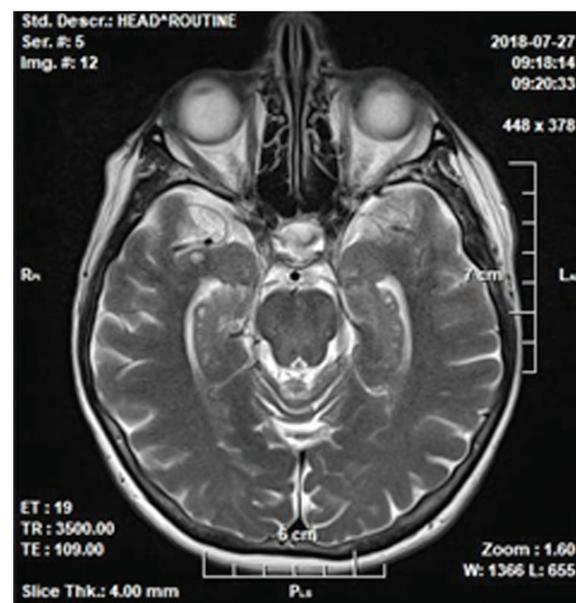
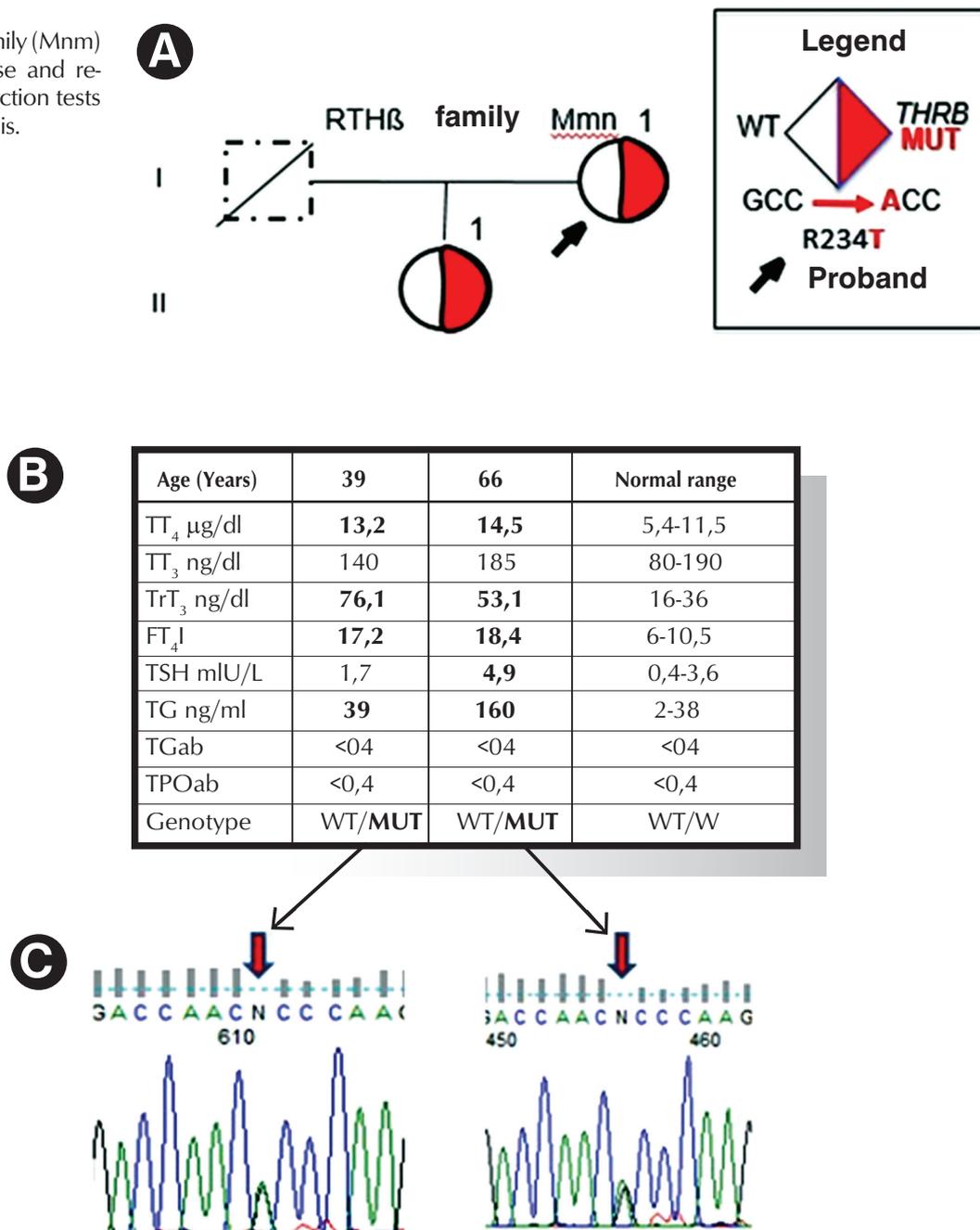


Figure 4.

Pituitary magnetic resonance imaging – clinical case 2. Microadenoma in the sella turcica with dimensions 2,5/4,0/6,3 mm.

Figure 5.

Pedigree of the family (Mnm) of the second case and results of thyroid function tests and genetic analysis.



The proband (I-1) underwent a partial thyroidectomy five year earlier.

(A) The pedigree with generations indicated by Roman numerals and subjects by Arabic numbers. WT-wild-type or common type, MUT-mutant.

(B) Results of thyroid function tests are aligned with each symbol representing a member of the family. Abnormal values are in bold red numbers. TT₄- total T₄, TT₃- total T₃, TrT₃- total reverse T₃, FT₄I - free T₄ index, TSH - thyroid-stimulating hormone, TG - thyroglobulin, TGab - thyroglobulin antibodies, TPOab - thyroperoxidase antibodies.

(C) Electropherograms of a portion of THRβ gene (exon 7 forward sequence) showing a heterozygous mutation (see legend) in subjects I-1 and II-1.

Conclusion

In most patients, the syndrome of RTH β appears to be successfully compensated by increased endogenous TH production, and in most cases the individuals are clinically euthyroid. Failure to recognize the symptoms and signs of these rare syndromes leads to inappropriate reduction of TH levels with antithyroid drugs or permanently with radioiodine and surgical resection. Such therapeutic decisions may exacerbate the signs of tissue hypothyroidism in resistant tissues and again lead to imbalance between the temporarily normalized T₄ values and the clinical complaints.

Levothyroxine replacement therapy after partial or complete thyroid ablation should be titrated by using the pre-treatment TSH, FT₄ and FT₃ levels of the patient as a target, as well as concomitant monitoring of parameters that assess thyroid hormone action on peripheral tissues, such as SHBG, cholesterol, ferritin and creatinine kinase (6).

Acknowledgements: This work was supported in part by grant DK15070 from the National Institutes of Health (USA).

References

1. **Refetoff S, DeWind LT, DeGroot LJ.** Familial syndrome combining deaf-mutism, stippled epiphyses, goiter and abnormally high PBI: Possible target organ refractoriness to thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1967; 27(2): 279-294.
2. **Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ.** Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 2010; 31: 139-170.
3. **Bassett JH, Harvey CB, Williams GR.** Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extranuclear actions. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 213: 1-11.
4. **Oetting A, Yen PM.** New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007; 21:193-208.
5. **LaFranchi SH, Snyder DB, Sesser DE, Skeels MR, Singh N, Brent GA, et al.** Follow-up of newborns with elevated screening T₄ concentrations. *J Pediatr* 2003; 143: 296-301.
6. **Dumitrescu AM, Korwutthikulrangsri M, Refetoff S.** Impaired Sensitivity to thyroid hormone: Defects of Transport, Metabolism and Action IN: Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text; *Eleventh Edition*, LE Braverman, DS Cooper and P Kopp (eds), Wolters Kluver / Lippincott, Williams & Wilkins Publications, Philadelphia, pp. 868-907, 2020.
7. **Yagi H, Pohlenz J, Hayashi Y, Sakurai A, Refetoff S.** Resistance to thyroid hormone caused by two mutant thyroid hormone receptors β , R243Q and R243W, with marked impairment of function that cannot be explained by altered in-vitro T₃-binding affinity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1608-1614.
8. **Barkoff MS, Kocherginsky M, Anselmo J, Weiss RE, Refetoff S.** Autoimmunity in patients with resistance to thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 3189-3193.

Уринна йодна концентрация при бременни жени от различни региони на България

Борисова, Анна-Мария И.^{1,2}, Иванова, Людмила Б.², Трифонова, Бояна Ц.^{1,2}, Даковска, Лилия Н.¹, Михайлова, Евгения Н.¹, Вуков, Мирчо И.¹

¹ Клиника по Ендокринология, Университетска Болница „Софиямед“;

² Медицински факултет, Софийски Университет „Свети Климент Охридски“, София, България

Адрес за кореспонденция:

Проф. Анна-Мария Борисова, гмн
Университетска Болница „Софиямед“,
МФ, Софийски университет „Св. Климент Охридски“
Ул. „Димитър Моллов“ 10; София-1750,
e-mail: anmarbor@abv.bg

Постъпване: 13. 07. 2020

Приемане: 05. 08. 2020

Резюме

Уринната йодна концентрация (UIC) отразява реалния прием на йод и се използва за оценка на йодния прием на популационно ниво.

Целта на проучването е да се направи оценка на актуалния прием на йод от бременни жени в България чрез анализ на медианата на уринната йодна концентрация (mUIC).

Материал: Изследвани са 537 бременни жени на средна възраст 30,49±5 г. Проведено е срезово многоцентрово популационно-базирано проучване през 2019 г. в общо 84 селища на България - с известен в миналото йоден дефицит (Смолян, Гоце Делчев, Троян, Габрово, София и областта) и с йодна достатъчност (Плевен, Бургас, Стара Загора).

Методи: Изследван е количествено TSH с ECLIA метод и е определена уринната йодна концентрация със сертифицирана индуктивно свързана плазмена масспектрометрия (ICP-MS).

Резултати: В 3 региона се установи леко понижена mUIC (Гоце Делчев – 144,5 µg/L, Габрово – 130,5 µg/L и Троян – 113,5 µg/L). Направи се сравнение между тези 3 региона и останалите 7 с нормални нива mUIC и се потърси причината за тази разлика. Значимо повече бременни от Габрово-Троян-Гоце Делчев са с ниска UIC при сравнение с бременните от другите градове (59% срещу 38,1%) и обратното – значимо по-малко от тях имат над-оптимална UIC (6,4% срещу 21,8%), $p < 0,001$. Бременните, които не приемат никакви медикаменти, в това число и комбинирани витамини с минерали, от Габрово-Троян-Гоце Делчев са 23,1% или 1/4 от изследваните там срещу 15,7% или 1/6 от бременните в останалите 7 града ($p < 0,006$).

Заключение: По време на бременност е важно да се субституира с комбинирани витамини с минерали, с което да се осигурява достатъчен за този период допълнителен прием на йодид.

Ключови думи: уринна йодна концентрация – ниска, нормална, над-оптимална; бременност; суплементация

Въведение

Йодният дефицит е социално значим проблем, който засяга значителна част от населението в региони с ниско съдържание на йод в околната среда, т.нар. ендемични региони. Най-ефективната профилактична стратегия за поддържане на адекватен прием на йод от цялото население в тези региони е обогатяване с елемента на масово консумиран продукт, като солта.

Първата гържавна програма за превенция на йодния дефицит стартира през 1869 г. в три ендемични департамента на Франция. Тя скоро е прекратена поради странични ефекти (йод-Базедов), вследствие на избраната много висока концентрация на йод – 100 до 500 mg/kg сол (1). За първи път йодиране на солта с профилактична цел е въведено в Швейцария и САЩ през 1920 г. и резултатите са доказали, че това е успешна мярка за профилактика на йодния дефицит (2). През 1941 г. масово йодиране на солта се въвежда в Нова Зеландия, а в периода 1950-1960 г. голям брой страни в Европа, в това число и България, въвеждат този ефективен и икономически изгоден метод за успешна профилактика на йодния дефицит. През 1956 г. у нас е създадена специална Група от експерти-ендокринолози за изучаване на гушавостта в България и се провежда масов скрининг (4000 селища, 1 000 000 население), при което се установява 50% гушавост и 3% кретенизъм. Анализира се съдържанието на йод в почва и вода от различни области на страната и се изготвя карта на ендемичните региони на база степента на гушавост. Създава се първата Национална програма за профилактика на ендемичната гуша чрез въвеждане на йодирана сол в ендемичните региони. Налага се разбирането за необходимост от гържавна политика за решаване на това заболяване и Министерски съвет на НРБ издава Постановление за задължително йодиране на солта – 16 октомври 1958 г. (3). За първи път „универсално“ йодиране на солта на цялата територия на България, обаче, е въведено едва през 1994 г., след което в сравнителни кратки срокове се постигат значителни резултати. През 2005 г. оценката на международна експертна група поставя страната сред успешно преодолелите проблема „йоден дефицит“ (4).

Препоръчаният стандарт през 1994 г. за йодиране на солта от World Health Organization (WHO)/United Nations Children's Fund (UNICEF) е 20-40 ppm, което гарантира адекватен дневен прием на йод 150 µg при средно-дневна консумация на сол от 10 g (5). Екскрецията на йод с урината (уринна йодна концентрация – UIC) отразява

реалния прием на йод и се използва за оценка на йодния прием на популационно ниво. При среднодневен прием на йод от 150 µg екскрецията на йод в случайна порция урина варира в интервала 100-199 µg/L (6). Когато медианата на популационна група от ученици на възраст 6-11 години е в този интервал, тя отразява адекватен йоден прием. При бременни жени потребностите от йод нарастват с около 70% спрямо небременните, поради което медианата на UIC (mUIC) трябва да бъде съответно по-висока – 150-249 µg/L. Причината е в променения физиологично по време на бременност метаболизъм на йода. От една страна е повишена бъбречната загуба на йода поради повишената гломерулна филтрация, а от друга страна нарастването на hCG (human chorionic gonadotropin) води до повишение на тиреоидната функция и от тук - и до повишена консумация на субстрата йод за синтез на по-големи количества хормони. Допълнителни фактори са нарастването с около 50% на protein-bound T4/T3, както и високия трансфер на йод през плацентата. Тази промяна по време на бременност е причината за възприемане на различна норма на UIC и невъзможността да се прилага тя за общата популация (7-9).

Развитието на мозъка на плода е комплексен процес, който започва в ранната бременност и продължава в първите години на живота. Интелигентността на човек зависи от развитието на нервната тъкан, а тиреоидните хормони са основни за развитието ѝ (10-12).

Целта на настоящото проучване е да се направи оценка на актуалния прием на йод от бременни жени в България на национално и регионално ниво чрез анализ на уринната йодна концентрация.

ДИЗАЙН: Проведено е срезово многоцентрово популационно-базирано проучване в периода от 25 септември до 6 ноември 2019 г. в 10 региона на България – София и Софийска област - Самоков, Пиргон и околните села, Смолян, Гоце Делчев, Габрово, Троян-Априлци, Бургас, Стара Загора, Плевен или общо 84 селища. Подборът на регионите не беше случаен. Бяха включени ендемични региони с известен в миналото йоден дефицит, като Смолян, Гоце Делчев, Габрово, Троян, София-град, Софийска област, както и региони с йодна достатъчност – Бургас, Стара Загора, Плевен и областите им. Проучването се осъществи благодарение на сътрудничество на 104 ендокринолози и гинеколози, които поканиха за участие в скрининга над 630 бременни жени. От тях участие взеха 537 бременни жени (85,2%). Разпределението на участничките по региони е представено в Таблица 1 (Табл. 1).

Материал

Изследваните 537 бременни жени са на средна възраст $30,49 \pm 5$ г. [95% CI:30,06-30,91], медичана – 30 г. (18-47 г.) [95% CI:30-31]. В Таблица 2 е представена средната възраст на бременните жени по региони, като не се установи значима разлика между тях. Най-младите са в Гоце Делчев ($27,85 \pm 5,48$ г.), а най-възрастните – в София ($31,39 \pm 3,98$ г.) (Табл. 2).

Всички участнички са подписали информирано съгласие, потвърдено от локалната Комисия по етика в Университетска Болница „Софиямед“, като то е подготвено в съгласие с етичните стандарти според декларацията от Хелзинки – 1964 г. и по-късните ѝ допълнения (13). Всяка бременна жена е попълнила лично въпросник с помощта на специално определено медицинско лице от екипа „лице в лице“ с цел коректно събиране на данни относно история на бременността, фамиленост, прием на комбинирани витамини с минерали, други медикаменти по вид и дози, за налични тиреоидни или други заболявания.

Оказа се, че 85% (458/537) от бременните жени са приемали медикаменти [Magnesium supplements – 125 (23,27%), Acid Folic – 118 (21,9%), Micronised progesterones – 23 (4,2%), Iron supplements – 64 (11,9%), Spasmolytics – 32 (5,9%), Aspirin – 30 (5,5%), Low molecular weight heparins – 27 (5,0%), Levothyroxine/тиреостатик – 77 (14,3%), Methyl dopa – 4 (0,7%)] – самостоятелно или в различни комбинации. Основно, обаче, в над 50% (271/537) от случаите това са били комбинирани витамини с минерали, които са приемани самостоятелно или заедно с други медикаменти, според протокола при АГ специалистите и така се осигурява по 150 μ g йод дневно. Най-често от медикаментите се срещат магнезий, фолиева киселина и желязо (57%), докато останалите препарати са давани на отделни бременни жени с цел запазване на бременността и довеждането ѝ до успешен завършек – спазмолитици, прогестини, антикоагуланти. При 77 (14,3%) от бременните е установена субституция с Levothyroxine или тиреостатик за известно тиреоидно заболяване. Всички участнички са от кавказката раса, без данни за чернодробни, бъбречни заболявания или данни за малабсорбция. Бременните жени са следвали обичайния си дневен режим на живот през предходните месеци.

Методи

След попълване на персоналия Въпросник, на всяка бременна жена е взета на гладно сутрешна венозна кръв от кубиталната вена, проба прясна-сутрешна урина, проведено е ехографско изслед-

ване на щитовидната жлеза.

Основните индикатори, които определят йод-дефицитното състояние са: размерът на уринната йодна концентрация, нивото на TSH и обемът на щитовидната жлеза. Основен критерий за оценка на реалния прием на йод е концентрацията на йод в урината (UIC), тъй като 90% от приетото количество се екскретира в урината пасивно в първите 24 часа в зависимост от eGFR) (14). Така, UIC при равномерен хранителен прием представя равновесието между диетичния прием, тиреоидната йодна екстракция, общото тиреоидно хормонално депо и размера на гломерулна филтрация (GFR).

Приложен алгоритъм при скрининга:

1. *Определяне на гушавостта сред изследваната популация.* Освен палпация на шийната област за определяне размера на щитовидната жлеза е проведено и ехографско изследване, като обемът е изчислен по стандартна формула и представен в mL (15-17).

2. *Лабораторният анализ* на всички кръвни проби е проведен в една Централна лаборатория в деня на вземане на кръвната проба сутрин на гладно. Използвани са вакутейнери за серум със сепарационен гел, които са транспортирани центрофугирани до лабораторията. Изследван е количествено TSH с ECLIA метод тип сандвич на анализатор Cobas e 601. Резултатите са изразени в mIU/L (референтни граници: 0.27-4.2).

3. *Определена е уринната йодна концентрация (UIC).*

Анализът на уринната йодна концентрация се извършва в случайна порция сутрешна урина. В специални добре затворени контейнери се поставя ~20 mL урина, която се транспортира до централната лаборатория за анализ. Урините се замразяват и се съхраняват на -20°. Замразените проби се изпращат за анализ в лабораторията Limbach Laboratory, Heidelberg, Germany. Методът за анализ е сертифицирана индуктивно свързана плазмена масспектрометрия (ICP-MS), със следните характеристики на метода: линеен диапазон на стандартната крива в интервала 0–4000 μ g/L, прецизност в серия при 304 μ g/L, вътрешно лабораторна възпроизводимост (RSD) 0,8%, възпроизводимост в серия със Seronorm™ Trace Elements urine (SNU): (RSD) 4,5%, n=15, аналитичен гобив 104%. Резултатите са представени в μ g/L.

Съгласно трите международни организации - World Health Organization (WHO), International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders (ICCIDD) и United Nations Children's Fund (UNICEF) йоден дефицит се дефинира при mUIC пог 100

Таблица 1. Разпределение на бременните жени по брой и процент по региони.

Област	Брой	Процент	Валиден процент	Кумулативен процент
Бургас	102	19,0	19,0	19,0
Гоце Делчев	20	3,7	3,7	22,7
Габрово	34	6,3	6,3	29,1
Пиргон	9	1,7	1,7	30,7
Плевен	83	15,5	15,5	46,2
Самоков	29	5,4	5,4	51,6
Смолян	24	4,5	4,5	56,1
Стара Загора	84	15,6	15,6	71,7
София	128	23,8	23,8	95,5
Троян	24	4,5	4,5	100,0
Общо	537	100,0	100,00	

Таблица 2.

Средна възраст на бременните жени по местоживееене.

Регион	Средна стойност	Стандартно отклонение
Бургас	31,069	5,243
Гоце Делчев	27,850	5,480
Габрово	31,265	4,999
Пиргон	30,444	7,350
Плевен	29,880	5,279
Самоков	30,000	6,777
Смолян	28,750	5,024
Стара Загора	30,571	4,752
София	31,398	3,985
Троян	28,458	5,013
Общо	30,490	5,062

µg/L за общата популация и децата, докато нормалните стойности за бременни жени трябва да бъдат между 150-249 µg/L (15, 18). За долна референтна граница на UIC при бременни жени се приема 150 µg/L като при mUIC на група под тази стойност се приема, че има риск от йоден дефицит (19, 20). Възприетите интервали за оценка на UIC според медианата на показателя при бременни жени е: ниска 1-149 µg/L, нормална 150-249 µg/L, над-оптимална > 250 µg/L.

Статистическият анализ е проведен с помощта на стандартен SPSS 13.0 for Windows: дескриптивен анализ (средна стойност, стандартно отклонение, медиана); корелационен анализ и

анализ на вариациите (ANOVA, post-hoc test - with Bonferroni alpha correction), параметричен и непараметричен анализ, включващ - Chi-Square Test, Fisher's Exact Test, Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk Tests, Levene's Test for Equality of Variances, Student's t-test, Kruskal-Wallis test и Mann-Whitney test. Всички количествени променливи са представени като средна стойност и стандартно отклонение, медиана или процент, P стойност под 0,05 е приета за статистически сигнификантна.

Резултати

Средното ниво на UIC за цялата група бременни жени (n=537) е 181,605±93,972 µg/L, а медианата на уринната йодна концентрация (mUIC) за цялата група бременни жени (n=537) е 170 µg/L (11 µg/L-497 µg/L), (95% доверителен интервал 161 µg/L-177 µg/L), 20ти перцентил 102 µg/L, 80ти перцентил - 248,0 µg/L. В следващата Таблица 3 се представя средното ниво на UIC и mUIC във всеки изследван регион. Установи се, че бременните жени само от Троян, Габрово и Гоце Делчев имат mUIC под долната референтна граница на нормата за бременни жени от 150 µg/L (Табл. 3).

Както се вижда само в три региона се установи леко понижена mUIC [Габрово - 130,5 µg/L (108-168), Троян - 113,5 µg/L (93-185), Гоце Делчев - 144,5 µg/L (119-208)]. Направи се сравнение между тези три региона и останалите седем с нормални нива на mUIC и се потърси причината за тази разлика.

Общият брой бременни жени в Габрово, Троян и Гоце Делчев е 78 (14,5%), а в останалите 7

Таблица 3. Нива на уринна йодна концентрация в десетте региона на страната. (mean±SD и median, 95% CI for median).

Регион	Средна стойност	Стандартно отклонение	Медиана	95% CI	
				Lower Bound	Upper Bound
Бургас	182,1	91,5	167,5	152,0	182,0
Г. Делчев	161,8	87,1	144,5	119,0	208,0
Габрово	144,7	69,0	130,5	108,0	168,0
Пирдоп	163,5	71,8	176,0	89,0	224,0
Плевен	186,5	97,5	172,0	146,0	204,0
Самоков	245,6	113,5	201,0	171,0	306,0
Смолян	187,5	73,6	181,0	130,0	231,0
Стара Загора	170,6	89,8	162,0	141,0	186,0
София	192,1	99,5	178,0	160,0	200,0
Троян	137,3	66,6	113,5	93,0	185,0
Общо	181,6	94,0	170,0	161,0	177,0

Таблица 4. Разпределение на бременните жени според нивото на UIC в Габрово-Троян-Гоце Делчев срещу останалите 7 региона.

Ниво на йодурия	Габрово-Троян-Гоце Делчев (n-78)	Другите 7 региона (n-459)	Общо (n-537)
1-149 µg/L	46 (59%)*	175 (38,1%)*	221 (41,1%)
150-249 µg/L	27 (34,6%)	184 (40,1%)	211 (39,3%)
250-497 µg/L	5 (6,4%)*	100 (21,8%)*	105 (19,6%)
Общо	78 (100%)	459 (100%)	537 (100%)

*p<0,001(Fisher's Exact Test)

региона е 459 (85,5%). Според нивото на UIC бременните са разпределени в 3 подгрупи – А) ниска 1-149 µg/L (41,2%); Б) нормална 150-249 µg/L (39,3); В) над-оптимална 250-497 µg/L (19,6%). Разпределението на бременните жени според тези три нива на UIC от Габрово-Троян-Гоце Делчев срещу останалите 7 региона се представя в Таблица 4 (Табл. 4).

Общо за страната ниска UIC е налице при 221 бременни жени (41,1%), а нормална и над-оптимална – при 316 бременни (58,9%). Оказва се, че значимо повече бременни жени от Габрово-Троян-Гоце Делчев са с ниска UIC при сравнение с бременните от другите региони (59% срещу 38,1%) и обратното – значимо по-малко от тях имат над-оптимална UIC (6,4% срещу 21,8%), p < 0,001.

Обемът на тиреоидеята в трите региона в сравнение с останалите седем не показва значима разлика (7,7±2,3 mL срещу 8,3±2,4 mL, NS).

На какво се дължи леко понижената уринна йодна концентрация в Габрово-Троян-Гоце Делчев?

Анализира се приемът на комбинирани витамини с минерали или други лекарства в цялата група изследвани бременни жени. Оказва се, че 79 бременни жени (14,71%) не приемат нищо (група А), 271 (50,47%) от бременните приемат комбинирани витамини с минерали (група Б) и 187 (34,82%) приемат други лекарства без витамини (група В). В Таблица 5 представяме общо приема на медикаменти по видове за цялата група от 537 бременни жени, както и отделно в двете подгрупи региони (Табл. 5).

Прием на медикаменти по вид	Габрово-Троян-Гоце Делчев	Другите 7 региона	Общо
Група А Не приемат медикаменти	18 (23,1%)*	72 (15,7%)*	90 (16,8%)
Група Б Приемат комбинирани витамини с минерали	27 (34,6%)	248 (54%)	275 (51,2%)
Група В Приемат други медикаменти различни от витамини	33 (42,3%)	139 (30,3%)	172 (32%)
Общо	78 (100%)	459 (100%)	537 (100%)

Таблица 5.

Прием на медикаменти в Габрово-Троян-Гоце Делчев срещу останалите 7 региона.

* $p < 0,006$ Fisher's Exact Test

Оказва се, че приемът на комбинирани витамини с минерали се явява решаващ за поддържане на нормална УИС. Бременните жени, които не приемат никакви медикаменти в това число и комбинирани витамини с минерали от Габрово-Троян-Гоце Делчев са 23,1% или 1/4 от изследваните там срещу 15,7% или 1/6 от бременните в останалите 7 региона ($p < 0,006$, Fisher's Exact Test). Ако се обединят Група А и В (не приемат витамини) и се сравнят с Група Б (приемат комбинирани витамини с минерали), ще се установи, че 65,4% от бременните в Габрово-Троян-Гоце Делчев или почти 2/3 не приемат витамини срещу 46% в останалите 7 региона ($p < 0,006$).

Изводът от този анализ е, че има значимата разлика между тези три региона на страната (Габрово-Троян-Гоце Делчев) и другите седем по отношение приема на комбинирани витамини с минерали. Очевидно по време на бременност е важно да се субституира с комбинирани витамини с минерали, с което да се осигурява достатъчен за този период допълнителен прием на йо-

диг. Така може да се поддържа нормална уринна йодна концентрация по време на бременност.

Благодарности:

Авторите благодарят на 104 ендокринолози и акушер-гинеколози, които подкрепиха проекта: В. Йотова (Троян), С. Димитрова (Габрово), Анчев (Габрово), Митев (Габрово), А. Попов (Гоце Делчев), А. Андреев (Самоков), Е. Апостолова (Смолян), М. Хубчев (Смолян), С. Димитров (Пиргон), Р. Наумовска (Плевен), М. Манцелиан (Бургас), К. Кироваков (Бургас), Габровска (Бургас), М. Ангелова (Стара Загора), К. Венкова (София), Р. Велев (София), И. Сигридов (София), Б. Богословова (София) ... общо 104 специалисти от страната.

Техническа подкрепа: Т. Корнилова (София), З. Методиева (София), Ю. Георгиева (София), Х. Атанасова (Бургас), Л. Илиева (Стара Загора).

Проектът е подкрепен с грант от Българско Дружество по Ендокринология като част от Национална епидемиологична Програма за бременни жени в България, 2019 години.

Urine Iodine Concentration in Pregnant Women from Different Regions of Bulgaria

Borissova, Anna-Maria I.^{1,2}, Ivanova, Lyudmila B.², Trifonova, Boyana T.^{1,2}, Dakovska, Lilia N.¹, Mihailova, Eugenia N.¹, Vukov, Mircho I.¹

¹ Clinic of Endocrinology, „Sofiamed“ University Hospital, Sofia, Bulgaria

² Faculty of Medicine, Sofia University „St. Kliment Ohridski“, Sofia, Bulgaria

Address for correspondence:

Prof. Anna-Maria Borissova, PhD, DMedSci
University Hospital „Sofiamed“, Faculty of Medicine,
Sofia University „Sv. Kliment Ohridski“
10, Dimitar Mollov Str., Sofia – 1750
e-mail:anmarbor@abv.bg

Submitted: 13. 07. 2020

Accepted: 05. 08. 2020

Abstract

Urinary iodine concentration (UIC) is used to assess iodine intake at the population level.

The aim of the study was to assess the current iodine intake of pregnant women in Bulgaria by analyzing the median urinary iodine concentration (mUIC).

Material: 537 pregnant women, mean age of 30,49±5 years were studied. A cross-sectional multicenter population-based study was conducted in 2019 in a total of 84 settlements in Bulgaria consisting of regions with a known iodine deficiency in the past (Smolyan, Goce Delchev, Troyan, Gabrovo, Sofia), as well as regions with iodine sufficiency (Pleven, Burgas, Stara Zagora).

Methods: TSH was quantified by the ECLIA method and the UIC was determined by certified inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

Results: In three regions a slightly reduced mUIC was found (Gotse Delchev, Gabrovo, Troyan). A comparison was made between these three regions and the other seven with normal mUIC. Significantly more pregnant women from Gabrovo-Troyan-Gotse Delchev had low UIC (<149 µg/L) compared to pregnant women from other regions (59% vs 38,1%) and conversely significantly fewer of them had over-optimal UIC (>250 µg/L) – 6,4% vs 21,8%, p<0,001. Pregnant women who did not take any medications, including combined vitamins with minerals from Gabrovo-Troyan-Gotse Delchev were 23,1% vs 15,7% in the other seven regions (p<0,006).

Conclusion: During pregnancy it is important to substitute with combined vitamins and minerals to ensure sufficient additional intake of iodide for this period.

Key words: urinary iodine concentration - low, normal, over-optimal, pregnancy, supplementation

Introduction

Iodine deficiency is a socially significant problem that affects a significant part of the population in regions with low iodine content in the environment, the so-called endemic regions. The most effective prophylactic strategy for maintaining adequate iodine intake by the entire population in these regions is enrichment with the element of a mass-consumed product, such as salt.

The first state program for the prevention of iodine deficiency started in 1869 in three endemic departments of France. It was soon discontinued due to side effects (iodine-Bazedov), due to the chosen very high concentration of iodine – 100 to 500 mg/kg of salt (1). Salt iodization was first introduced for prophylactic purposes in Switzerland and the United States in 1920, and the results proved that it was a successful measure for the prevention of iodine deficiency (2). In 1941, mass iodization of salt was introduced in New Zealand, and in the period 1950-1960 a large number of countries in Europe, including Bulgaria, introduced this effective and cost-effective method for the successful prevention of iodine deficiency. In 1956, a specialist group of endocrinologists was established in Bulgaria to study goiter in the country and mass screening (4 000 settlements, 1 000 000 population) was conducted, during which 50% goiter and 3% cretinism were established. The iodine content in soils and water from different areas of the country was analyzed and a map of endemic regions was prepared based on the degree of goiter. This resulted in the first National Program for the prevention of endemic goiter by introducing iodized salt in endemic regions. The understanding of the need for a state policy to solve this disease was necessary and the Council of Ministers of the People's Republic of Bulgaria issued a Decree on mandatory iodization of salt – October 16, 1958 (3). The first time, however, „universal“ iodization of salt in the whole of Bulgaria was introduced was not until 1994, after which significant results were achieved in a relatively short time. In 2005, the evaluation of an international expert group placed the country among those who had successfully overcome the problem of „iodine deficiency“ (4).

The recommended standard set in 1994 for salt iodization by the World Health Organization (WHO) / United Nations Children's Fund (UNICEF) is 20-40 ppm, which guarantees an adequate daily intake of 150 µg of iodine with an average daily salt consumption of 10 g (5). Urinary iodine concentration (UIC) reflects actual iodine intake and is used to assess iodine intake at the population level. At an average daily iodine intake of 150 µg, the excretion of iodine in a random portion of urine varies in the range of 100-199 µg/L (6). When the median of a population group of children aged 6-11 years is in this range, it reflects adequate iodine intake.

In pregnant women, iodine requirements increase by about 70% compared to non-pregnant women, so the median of UIC (mUIC) should be correspondingly higher – 150-249 µg/L. The reason for this is the physiologically altered iodine metabolism during pregnancy. On the one hand, renal iodine loss is increased due to increased glomerular filtration, and on the other hand, the increase in hCG (human chorionic gonadotropin) leads to increased thyroid function and hence to increased consumption of iodine substrate for the synthesis of larger amounts of hormones. Additional factors are an increase of about 50% in protein-bound T_4/T_3 , as well as high iodine transfer across the placenta. This change during pregnancy is the reason for the perception of a different rate of UIC and the inability to apply that to the general population (7-9).

The development of the fetal brain is a complex process that begins in early pregnancy and continues in the first years of life. A person's intelligence depends on the development of nervous tissue, and thyroid hormones are essential for its development (10-12).

The aim of the present study was to assess the current iodine intake of pregnant women in Bulgaria at the national and regional level by analyzing the urine iodine concentration.

Design

A cross-sectional multicenter population-based study was conducted in the period from September 25 to November 6, 2019 in 10 regions of Bulgaria – Sofia and Sofia region – Samokov, Pirdop and the surrounding villages, Smolyan, Gotse Delchev, Gabrovo, Troyan-Apriltsi, Burgas, Stara Zagora, Pleven or a total of 84 settlements. The selection of the regions was not random. Endemic regions with known iodine deficiency in the past were included, such as Smolyan, Gotse Delchev, Gabrovo, Troyan, Sofia-city, Sofia region, as well as regions with iodine sufficiency – Burgas, Stara Zagora, Pleven and their districts.

The study was carried out thanks to the cooperation of 104 endocrinologists and gynecologists, who invited more than 630 pregnant women to participate in the screening. Of these, 537 pregnant women (85,2%) took part. The distribution of participants by region is presented in Table 1 (Table 1).

Material

The 537 pregnant women studied had a mean age of 30,49±5 years, [95% CI: 30,06 – 30,91], median – 30 (18-47), [95% CI: 30-31]. Table 2 presents the average age of pregnant women by region, with no significant difference between them. The youngest were in Gotse Delchev (27,85±5,48 years), and the oldest – in Sofia (31,39±3,98 years) (Table 2).

All participants signed an informed consent, confirmed by the local Ethics Committee at Sofamed Uni-

versity Hospital, and it was prepared in accordance with the ethical standards according to the Helsinki Declaration of 1964 and its later additions (13).

Each pregnant woman filled in a personal questionnaire with the help of a specially designated medical person from the „face to face“ team in order to correctly collect data on the pregnancy history, the intake of combined vitamins with minerals, other medications by type and dose and any family history available for thyroid or other diseases.

It became apparent that 85% (458/537) of pregnant women were taking medication [Magnesium supplements – 125 (23,27%), Folic Acid – 118 (21,9%), Micronised progesterones – 23 (4,2%), Iron supplements – 64 (%), Spasmolytics– 32 (5,9%), Aspirin – 30 (5,5%), Low molecular weight heparins – 27 (5,0%), Levothyroxine/thyrostatic – 77 (14,3%), Methyldopa – 4 (0,7%)] – alone or in different combinations. However, mainly in 50,46% (271/537) of the cases these were combined vitamins with minerals, which were taken alone or together with other medications, according to the protocol of the gynecologists, and thus 150 µg iodine was provided daily. The most common drugs are magnesium, folic acid and iron (57%), while the other drugs are given to individual pregnant women in order to preserve the pregnancy and bring it to a successful conclusion – antispasmodics, progestins and anticoagulants. In 77 (14,3%) pregnant women, substitution with Levothyroxine or a thyrostatic was found for a known thyroid disease. All participants were Caucasian, with no evidence of liver or kidney disease or evidence of malabsorption. Pregnant women had been following their usual daily routine in previous months.

Methods

After filling in the personal Questionnaire, morning venous blood from the cubital vein and a sample of fresh morning urine was taken from each pregnant woman on an empty stomach and an ultrasound examination of the thyroid gland was performed.

The main indicators that determine iodine deficiency are: the urine iodine concentration (UIC), the level of TSH and the volume of the thyroid gland. The main criterion for assessing the actual iodine intake is the UIC, as 90% of the ingested amount is excreted in the urine passively in the first 24 hours depending on eGFR (14). Thus, the UIC with a uniform diet represents the balance between dietary intake, thyroid iodine extraction, total thyroid hormone depot and glomerular filtration rate (GFR).

Applied screening algorithm:

Determination of goiter among the studied population. In addition to palpation of the cervical region to determine the size of the thyroid gland, an ultrasound

examination was performed, the volume was calculated according to a standard formula and is presented in mL (15-17).

The laboratory analysis of all blood samples was performed in one Central Laboratory on the day of taking the blood sample in the morning on an empty stomach. Serum vacutainers with separation gel were used, which were transported centrifuged to the laboratory. TSH was quantified by the ECLIA sandwich method on a Cobas e 601 analyzer. Results are expressed in mIU/L (reference limits: 0,27-4,2).

Urine iodine concentration (UIC) is determined. The analysis of urine iodine concentration is performed in a random portion of morning urine. About 20 mL of urine is placed in special tightly closed containers and transported to the central laboratory for analysis. Urine was frozen and stored at -20° until all samples were collected for analysis. The frozen samples are sent for analysis to the Limbach Laboratory, Heidelberg, Germany. The analysis was performed using the accredited inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method with the following characteristic: linearity in the range of 0–4000 µg/L, precision in the series at 304 µg/L, RSD 0,8%, inter-assay SNU=304 µg/L, 15 shifts, RSD 4,5%; accuracy percentage deviation from adjusted nominal value of the certified reference material Seronorm™ Trace Elements urine (SNU) (304 µg/L): 4,0% (data set=4x12), recovery 104%. The results are in µg/L.

According to three international organizations – the World Health Organization (WHO), the International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders (ICCID) and the United Nations Children's Fund (UNICEF) iodine deficiency is defined at a median urinary iodine concentration (mUIC) below 100 µg/L for the total population and children, while normal values for pregnant women should be between 150-249 µg/L (15, 18). The lower UIC reference limit in pregnant women is 150 µg/L and the median group below this value is considered to be at risk of iodine deficiency (19, 20). The accepted intervals for assessment of UIC according to the median of the indicator in pregnant women is: low 1-149 µg/L, normal 150-249 µg/L, over-optimal >250 µg/L.

The statistical analysis was performed using standard SPSS 13,0 for Windows: descriptive statistics (mean, medians, standard deviation), correlation analysis and analysis of variance (ANOVA, post-hoc test - with Bonferroni alpha correction), using parametrical and non-parametrical methods, including - Chi-Square Test, Fisher's Exact Test, Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk Tests, Levene's Test for Equality of Variances, Student's t-test, Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney test. All quantitative variables were presented as mean with standard deviation, median or percentage (unless specified otherwise), p values below 0,05 were accepted as statistically significant.

Table 1. Number and percentage of pregnant women by regions.

Region	Number	Percentage	Valid percentage	Cumulative percentage
Burgas	102	19,0	19,0	19,0
Gotse Delchev	20	3,7	3,7	22,7
Gabrovo	34	6,3	6,3	29,1
Pirdop	9	1,7	1,7	30,7
Pleven	83	15,5	15,5	46,2
Samokov	29	5,4	5,4	51,6
Smolyan	24	4,5	4,5	56,1
Stara Zagora	84	15,6	15,6	71,7
Sofia	128	23,8	23,8	95,5
Troyan	24	4,5	4,5	100,0
Total	537	100,0	100,00	

Table 2. Average age of pregnant women by place of residence.

Region	Mean	Standard Deviation
Burgas	31,069	5,243
Gotse Delchev	27,850	5,480
Gabrovo	31,265	4,999
Pirdop	30,444	7,350
Pleven	29,880	5,279
Samokov	30,000	6,777
Smolyan	28,750	5,024
Stara Zagora	30,571	4,752
Sofia	31,398	3,985
Troyan	28,458	5,013
Total	30,490	5,062

Results

The mean UIC level for the whole pregnant group (n=537) was $181,605 \pm 93,972$ $\mu\text{g/L}$ and the mUIC for the whole pregnant group (n=537) was 170 $\mu\text{g/L}$ (11-497 $\mu\text{g/L}$), (95% confidence interval 161-177 $\mu\text{g/L}$), 20th percentile 102 $\mu\text{g/L}$, 80th percentile - 248 $\mu\text{g/L}$. The following Table 3 presents the mean UIC and the mUIC level in each study region. It was found that pregnant women only from Troyan, Gabrovo and Gotse Delchev have a mUIC below the lower reference limit of the norm for pregnant women of 150 $\mu\text{g/L}$ (Table 3).

As can be seen, only in three regions was the mUIC level slightly reduced [Gabrovo - 130,5 $\mu\text{g/L}$ (108-168), Troyan - 113,5 $\mu\text{g/L}$ (93-85), Gotse Delchev - 144,5 $\mu\text{g/L}$ (119-208)]. A comparison was made between

these three regions and the other seven with normal mUIC levels and the reason for this difference was sought.

The total number of pregnant women in Gabrovo, Troyan and Gotse Delchev is 78 (14,5%), and in the other seven regions it is 459 (85,5%). According to the level of UIC, pregnant women are divided into three groups - A) low 1-149 $\mu\text{g/L}$ (41,2%); B) normal 150-249 $\mu\text{g/L}$ (39,3%); C) over-optimal 250-497 $\mu\text{g/L}$ (19,6%). The distribution of pregnant women according to these three levels of UIC from Gabrovo-Troyan-Gotse Delchev against the other seven regions is presented in Table 4 (Table 4).

In total for the country low UIC is present in 221 pregnant women (41,1%), and normal and over-optimal in 316 pregnant women (58,9%). It transpired that significantly more pregnant women from Gabrovo-Troyan-Gotse Delchev have a low UIC compared to pregnant women from other regions (59% vs. 38,1%) and, conversely, significantly fewer of them have an over-optimal UIC (6,4% vs 21,8 %), $p < 0.001$.

What is the reason for the slightly reduced urine iodine concentration in Gabrovo-Troyan-Gotse Delchev regions?

The intake of combined vitamins and minerals or other drugs in the whole group of studied pregnant women was analyzed. It was revealed that 79 pregnant women (14,7%) did not take anything (Group A), 271 (50,47%) of pregnant women took combined vitamins with minerals (Group B) and 187 (34,82%) took other drugs without vitamins (Group C). Table 5 presents the total drug intake by type for the whole group of 537 pregnant women, as well as separately in the two subgroups of regions (Table 5).

It proved to be the case that the intake of combined vitamins with minerals is crucial for maintaining

Table 3. Levels of mean UIC and mUIC in the ten regions of the country (mean ± SD, Median, 95% CI for Median).

Regions	Mean	Standard deviation	Median	95% CI	
				Lower Bound	Upper Bound
Burgas	182,1	91,5	167,5	152,0	182,0
Gotse Delchev	161,8	87,1	144,5	119,0	208,0
Gabrovo	144,7	69,0	130,5	108,0	168,0
Pirdop	163,5	71,8	176,0	89,0	224,0
Pleven	186,5	97,5	172,0	146,0	204,0
Samokov	245,6	113,5	201,0	171,0	306,0
Smolyan	187,5	73,6	181,0	130,0	231,0
Stara Zagora	170,6	89,8	162,0	141,0	186,0
Sofia	192,1	99,5	178,0	160,0	200,0
Troyan	137,3	66,6	113,5	93,0	185,0
Total	181,6	94,0	170,0	161,0	177,0

Table 4.

Distribution of pregnant women according to the level of UIC in Gabrovo-Troyan-Gotse Delchev against the other seven regions.

Urine iodine concentration	Gabrovo-Troyan-Gotse Delchev (n=78)	Other seven regions (n=459)	Total (n=537)
1-149 µg/L	46 (59%)*	175 (38,1%)*	221 (41,1%)
150-249 µg/L	27 (34,6%)	184 (40,1%)	211 (39,3%)
250-497 µg/L	5 (6,4%)*	100 (21,8%)*	105 (19,6%)
Total	78 (100%)	459 (100%)	537 (100%)

*p<0,001(Fisher's Exact Test)

a normal UIC. Pregnant women who did not take any medications, including combined vitamins with minerals from Gabrovo-Troyan-Gotse Delchev made up 23,1% or 1/4 of those studied there against 15,7% or 1/6 of pregnant women in the other seven regions (p<0,006, Fisher's Exact Test). Combining Group A and C (did not take vitamins) and comparing with Group B (took combined vitamins with minerals), showed that 65,4% of pregnant women in Gabrovo-Troyan-Gotse Delchev or almost 2/3 did not take vitamins against 46% in the other seven regions (p<0,006).

The conclusion from this analysis is that there is a significant difference between these three regions of the country (Gabrovo-Troyan-Gotse Delchev) and the other seven in terms of intake of combined vitamins and minerals. Obviously, during pregnancy it is important to substitute with combined vitamins and minerals to ensure sufficient intake of iodide for this period. This can maintain a normal urine iodine concentration during pregnancy.

Acknowledgements

The authors thank the endocrinologists and obstetrician/gynecologists who provided local support: V. Jotova (Troyan), S. Dimitrova (Gabrovo), Anchev (Gabrovo), Mitev (Gabrovo), A. Popov (Goce Delchev), A. Andreev (Samokov), E. Apostolova (Smolyan), M. Hubshiev (Smolyan), S. Dimitrov (Pirdop), R. Naumovska (Pleven), M. Manuelyan (Burgas), K. Kirovakov (Burgas), Gabrovskva (Burgas), K. Venkova (Sofia), M. Angelova (Stara Zagora), R. Velez (Sofia), I. Sigridov (Sofia), B. Bogoslovova (Sofia) ... total 104 specialists in the country.

Technical support: T. Kornilova (Sofia), Z. Metodieva (Sofia), J. Georgieva (Sofia), H. Atanasova (Burgas), I. Ilieva (Stara Zagora).

This work was supported by grants from the Bulgarian Society of Endocrinology as part of the National Epidemiological Program for Pregnant Women in Bulgaria 2019.

Taking the drug by type	Gabrovo, Troyan, Gotse Delchev	Other seven regions	Total
Group A Do not take medication	18 (23,1%)*	72 (15,7%)*	90 (16,8%)
Group B Supplemented with vitamins and minerals	27 (34,6%)	248 (54%)	275 (51,2%)
Group C Take other medications other than vitamins	33 (42,3%)	139 (30,3%)	172 (32%)
Total	78 (100%)	459 (100%)	537 (100%)

Table 5.

Distribution of medication intake in Gabrovo-Troyan-Gotse Delchev against the other seven regions.

*p<0,006 Fisher's Exact Test

References

1. **Anonymous.** Goitre in Savoy. *Lancet* 1869; 2: 518.
2. **Marine D, Kimball OP.** The prevention of simple goiter in man. Parts III. *JAMA* 1919; 73: 1873-1874.
3. **Group for the study of goiter, a leading medical and social problem in Bulgaria, 1956.** Jubilee collection „50 years of the Bulgarian Society of Endocrinology“, ed. A-M. Borisova, publishers Simolini, Sofia, 2015, p. 17. (In Bulgarian) [Група за изучаване на гушавостта, водещ медико-социален проблем в България, 1956. Юбилеен сборник „50 години Българско дружество по ендокринология“, под ред. А-М. Борисова, изд. Симолини, София, 2015, стр. 17].
4. **van der Haar F.** Review of Progress towards Sustained Optimal Iodine Nutrition in Bulgaria, MoH, USAID, UNICEF, 2005, pp 32.
5. **World Summit for Children – Mid Decade Goal: Iodine Deficiency Disorders.** UNICEF–WHO Joint Committee on Health Policy, Geneva, *United Nations Children’s Fund, World Health Organization, 1994* (JCHPSS/94/2.7).
6. **Lindsay AL, De Benoist B, Dary O, Hurrell R.** Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva, *World Health Organization and Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2006.*
7. **Mortimer RH, Galligan JP, Cannell GR, Addison RS, Roberts MS.** Maternal to fetal thyroxine transmission in the human term placenta is limited by inner ring deiodination. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2247-2249.
8. **Burrow GN, Fisher DA, Larsen PR.** Maternal and fetal thyroid function. *N Engl J Med* 1994; 331: 1072-1078.
9. **Biban BG, Lichiardopol C.** Iodine Deficiency, Still a Global Problem? *Curr Health Sci J* 2017; 43(2): 103–111.
10. **Delange F.** The role of iodine in brain development. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 75-79.
11. **Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F.** Is neuropsychological development related to maternal hypo-thyroidism or to maternal hypothyroxinemia? *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3975-3987.
12. **Bernal J.** Thyroid hormones and brain development. *Vitam Horm* 2005; 71: 95-122.
13. **World Medical Association.** Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subject. *JAMA* 2013; 310(20):2191–2194.
14. **Soldin OP.** Controversies in urinary iodine determinations. *Clin Biochem* 2002; 35: 575–579.
15. **WHO, UNICEF, ICCIDD.** Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. *A guide for programme managers, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 2001.*
16. **Brunn J, Block U, Ruf G, Bos I, Kunze WP, Scriba PC.** Volumetric analysis of thyroid lobes by real-time ultrasound. *Dtsch Med Wochenschr* 1981; 106: 1338–1340.
17. **Zimmermann MB, Hess SY, Molinari L, de Benoist B, Delange F, Braverman LE, et al.** New reference values for thyroid volume by ultrasound in iodine sufficient school children: a World Health Organization/Nutrition for Health and Development Iodine Deficiency Study Group Report. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 231–237.
18. **WHO.** Iodine status worldwide: WHO global database on iodine deficiency. Geneva: *World Health Organization, 2004.*
19. **Lazarus J, Brown RS, Daumerie C, Hubalewska-Dydeiczak A, Negro R, Vaidya B.** 2014 European Thyroid Association guidelines for the management of subclinical hypothyroidism in pregnancy and in children. *Eur Thyroid J* 2014; 3(2): 76–94.
20. **Alexander EK, Pearce EN, Brent GA, Brown R, Chen H, Dosiou C, et al.** 2017 Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and the postpartum. *Thyroid* 2017; 27(3): 315–389.

Промени в обема и структурата на щитовидната жлеза, тиреоиден аутоимунитет при бременни жени – български данни от 2019 година

Борисова, Анна-Мария И.^{1,2}, Иванова, Людмила Б.², Трифонова, Бояна Ц.^{1,2}, Даковска, Лилия Н.¹, Михайлова, Евгения Н.¹, Вуков, Мирчо И.¹

¹ Клиника по Ендокринология, Университетска Болница „Софиямед“,

² Медицински факултет, Софийски Университет „Свети Климент Охридски“, София, България

Адрес за кореспонденция:

Проф. Анна-Мария Борисова, гмн

¹ Клиника по Ендокринология, Университетска Болница „Софиямед“,

² Медицински факултет, Софийски Университет „Свети Климент Охридски“, София, България

Постъпване: 13. 07. 2020

Ревизиране: 11. 10. 2020

Приемане: 18. 10. 2020

Резюме

По принцип бременността може да се развива в условията на лек йоден дефицит поради високите нужди в този период и това може да се наблюдава дори в зони с йодна достатъчност. Целта на изследването е да се потърси връзката между тиреоидния обем и специфичните за бременността фактори, както и да се определи честотата и характера на структурните тиреоидни промени при бременни.

Материал: Изследвани са 547 бременни жени, средна възраст 30 ± 5 г. Първа бременност се установи при 245 (45,1%) и поредна при 302 (54,9%) бременни жени.

Методи: Ултрасонографско изчисление на тиреоидния обем по стандартна формула; Определяне нивото на TSH, FT₄, ТРОАб чрез ЕСІІА метод; Измерване на уринната концентрация йодид (UIC) чрез акредитиран метод на индуктивна куплирана плазмена мас спектрометрия (ICP-MS).

Резултати: Наг 97% от бременните жени имат нормален тиреоиден обем - $8,94 \pm 2,62$ mL, което е свързано с нормалното средно ниво на UIC - $181,60 \pm 93,97$ μ g/L респ. медиана на UIC (mUIC) - 170 μ g/L (95% CI: 161-177). В хода на бременността тиреоидният обем нараства (първи триместър $8,42 \pm 2,55$ mL срещу трети триместър $9,31 \pm 2,80$ mL, $p < 0,011$). При първа бременност тиреоидният обем е по-малък в сравнение с обема при поредна бременност - $8,67 \pm 2,23$ mL срещу $9,15 \pm 2,85$ mL, $p < 0,01$. Тиреоидният обем при 55 бременни жени с ТРОАб(+) е значимо по-голям в сравнение с 492 бременни жени с ТРОАб(-) - $10,17 \pm 3,67$ mL срещу $8,80 \pm 2,42$ mL, $p < 0,002$. Оказва се, че тиреоидният обем е значимо по-голям и при новооткрита възлеста гуша - $9,77 \pm 2,81$ mL срещу $8,73 \pm 2,51$ mL, $p < 0,001$, както и при бременни жени с повече от един възел - $11,39 \pm 3,18$ mL срещу $8,77 \pm 2,48$ mL, $p < 0,001$. Възли на щитовидната жлеза са налице при 21,75% от бременните жени (основно кистозни), като само в 6,7% са били известни.

Заклучение: Тиреоидният обем при бременните българки е в наг 97% от случаите нормален и пряко отразява установената нормална средна йодурия при тях. Лекото му увеличение в хода на бременността е израз на физиологична адаптация в отговор на лек йоден дефицит в този период на повишени нужди.

Ключови думи: тиреоиден обем, триместър, поредна бременност, ТРОАб(+), възли

Въведение

Проучванията върху уринната йодна концентрация (UIC) при бременни жени в България са проведени през 1999 г. (Варна, 180 жени) (1), 2001 г. (София, 51 жени) (2), 2003 г. (национално, 355 жени) (3), 2008 г. (национално, 150 жени) (4). С изключение на проучването през 1999 г., при останалите са включени бременни жени само от втори и трети триместър. Резултатите от тези проучвания са анализирани от Л. Иванова и сътр. през 2013 г. (5). Авторите обобщават, че медианата на йодурията на бременните жени в България е на долната граница на референтния интервал, което показва невисок прием на йод и вероятно това е резултат от съзнателното ограничаване консумацията на сол, относително ниския стандарт за йодиране на солта и липсата на допълнително суплементиране с йодсъдържащи препарати на значителна част от бременните жени.

Този твърде дълъг интервал от 12 г., в който не е направен нито един скрининг на йодния и тиреоиден статус на бременните български жени, наложи да се организира и проведе системно изследване на тази важна част от популацията, което има твърде високо медико-социално значение.

В настоящия анализ се представя един много малък отрязък от цялостно популационно проучване, като се съсредоточаваме основно върху промени в тиреоидния обем, както и върху структурните промени в щитовидната жлеза (огнищни и дифузни) на бременните жени.

Бременността дава отражение върху обема на щитовидната жлеза, както и върху нейната функция. В страните с достатъчен йоден прием е установено, че обемът на щитовидната жлеза се увеличава с около 10% по време на бременност, а в области с недостиг на йод обемът нараства с 20-40% (6).

Още през 1921 г. Marine D и Kimball PO отбелязват, че оформянето на гуша по време на бременност е резултат на йоден дефицит и това може да се превентира с прием на йод (7). В Преамбюла на монографията *Iodine Deficiency Disorders and Their Elimination* 2017 под редакцията на Elizabeth N. Pearce (8) се цитира публикацията на Clements FW и сътр., 1960 г. (9) - „... les aspects pratiques de la lutte contre le goitre endémique, ainsi que la législation de la prophylaxie par l'iode.“ и от името на СЗО, се поставя въпроса за изключително простата и евтина превенцията с йод на ендемичната гуша. По принцип бременността може да се развива в условията на лек йоден дефицит поради високите нужди в този период и

това може да се наблюдава дори в зони с йодна достатъчност. Именно този йоден дефицит според Hintze G и сътр. (1991 г.) чрез повишение в TSH е причина за увеличението на щитовидната жлеза при бременни жени (10).

Rasmussen NG и сътр. (1989 г.) установяват увеличение в обема на щитовидната жлеза по време на бременност – от 20.2 ± 2.0 mL през втория триместър до 24.1 ± 2.2 mL през третия триместър, като в същото време не се открива промяна в нивото на TSH през бременността (11). Открит остава въпросът дали увеличението в тиреоидния обем по време на бременност отразява физиологична адаптация в области с лек йоден дефицит или това е патологично състояние, свързано с дефицита на йод. Нормалният обем на щитовидната жлеза е функция на приема на йод, подчертават и Berghout A и сътр. (12).

Основните стимулатори за растеж на щитовидната жлеза при бременност са TSH, човешкият хориален гонадотропин (hCG) и йодният дефицит, като по време на бременност TSH се гържи в рамките на нормалните си граници (13). Тиреоидният обем корелира с нивото на TSH. Този хормон спада през първия триместър и се връща към нивата си от преди бременността през третия триместър (14). Като се имат предвид промените в хода на бременността в нивото на TSH в нормалните му граници, трябва да допуснем, че тиреоидният обем вероятно не е повлиян от TSH.

В области с йодна достатъчност обемът на щитовидната жлеза не се увеличава по време на бременност, въпреки високото ниво hCG през първия триместър, но в този момент нивото на TSH е ниско. В области с йоден недостиг, обемът на щитовидната жлеза нараства и това вероятно е свързано с авторегулаторни механизми на йода върху растежа на тиреоидеята (15). Berghout A и Wiersinga W правят системен анализ на обема и функцията на щитовидната жлеза по време на бременност и достигат до заключение, че всъщност обемът и функцията на щитовидната жлеза по време на бременност се адаптират по физиологичен път за посрещане на повишените нужди от йод и енергия (15).

Честотата на възлестата гуша при здрави лица (без бременност), която е диагностицирана след ултрасонография се движи между 17-23% в региони с граничен йоден дефицит (16). С напредване на възрастта нараства и честотата на възлестата гуша в двата пола (жени: 20-46%, мъже: 7-23%) (17). При бременни жени честотата на възлестата гуша доказана след ултрасонография е 25% (18).

Причините за формирането на тиреоидни възли са многобройни и включват, както йодния дефицит, поддържащ хронично стимулиране на рецептора за TSH, така и други фактори – мутации в този рецептор, стимулация от hCG по време на бременност, активността на различни растежни фактори (IGF-1, epidermal growth factor). Повечето от изброените стимулиращи фактори могат да съществуват по време на бременност и това обяснява защо нарастват тиреоидните възли в този период (19).

Наше популационно проучване от 2012 г. (мъже и жени, възраст 20-80 г.) установи честота на възлестата гуша в 24,4%, като при жените тя е 32,1% и при мъжете 15,7%, $p < 0,001$. Оказа се, че при младите жени (20-29 г. възраст) честотата на възлестата гуша е 16%, а при над 70-годишните е 45% т.е. почти 3 пъти по-често (20).

Основните индикатори, които са свързани с наличието на йоден дефицит са три: UIC, нивото на TSH и обемът на щитовидната жлеза. На първо място е UIC, но и трите параметъра са тясно свързани по между си (21). Ето защо, при провеждане на скрининг относно състоянието на щитовидната жлеза при бременни жени в алгоритъма се включват и трите параметъра – оценка на UIC, определяне нивото на TSH и ултрасонографското изследване на щитовидната жлеза за измерване на обема ѝ, както и за установяване евентуалното наличие на структурни промени (огнищни и дифузни).

Целта на изследването е в срезово многоцентрово популационно базирано проучване да се потърси връзката между тиреоидния обем и специфичните за бременността фактори, да се определят честотата и характерът на структурните тиреоидни промени при бременни жени, както и доколко обемът и структурните промени са свързани с тиреоидния аутоимунитет.

Дизайн на проучването

Проведено е срезово многоцентрово популационно базирано проучване от 25 септември до 6 ноември 2019 г. в 10 региона на България (София, Софийска област – Пирдоп, Самоков; Смолян; Гоце Делчев; Габрово; Троян-Априлци; Бургас; Стара Загора; Плевен), като бяха включени малки градове и села от всеки регион или общо 84 селища. Подбрани са региони с известен в миналото йоден дефицит – София и областта, Смолян, Гоце Делчев, Габрово, Троян, както и региони с йодна достатъчност – Бургас, Стара Загора, Плевен и областите им. Проучването е проведено с подкрепата на 104 ендокринолога и гинеколога от посочените региони. От диспансерната

листа на регистрирани бременни при посочените специалисти са поканени за участие 630 бременни жени, като се отзоваха 86,8% от тях или 547 жени.

Материал

Изследвани са 547 бременни жени, средна възраст 30 ± 5 г., медиана 30 г. (18-47 г.) – 40% (28-32 г.), 23,4% (33-37 г.), 21% (23-27 г.), 8,4% (38-42 г.), 6% (18-22 г.) и 1,1% (43-47 г.). Според триместъра бременните жени са разпределени, както следва: първи – 110 (20,10%), втори – 276 (50,45%) и трети – 161 (29,43%).

Всички бременни жени са от Кавказката раса, без данни за чернодробни, бъбречни заболявания или малабсорбция. Участничките са подписали информирано съгласие, потвърдено от локалната Комисия по етика в Университетска болница „Софиямед“, Софийски университет „Свети Климент Охридски“, като то е подготвено в съгласие с етичните стандарти според декларацията от Хелзинки – 1964 г. и по-късните ѝ допълнения (22). Всяка бременна жена е попълнила лично Въпросник с помощта на специално определено медицинско лице от екипа „лице в лице“ с цел коректно събиране на данни относно историята на бременността, прием на комбинирани витамини с минерали, витамин D, други медикаменти по вид и дози, налични тиреоидни или други заболявания. По данните от Въпросника се изясни, че при 245 (44,8%) жени се касае за първа бременност, при 216 (39,5%) – за втора, при 57 (10,4%) – за трета, при 19 (3,5%) – за четвърта и при 10 (1,8%) – за пета и шеста бременност. Оперативно лечение на щитовидната жлеза преди настоящата бременност е проведено при 9 (1,6%) бременни жени. При 151 (27,6%) бременни жени се установи нарушена функция на щитовидната жлеза – 144 (26,3%) хипотиреоидизъм, 7 (1,3%) хипертиреоидизъм, а 77 (14,07%) са на лечение свързано с тиреоидеята (76 с Левотироксин и 1 с тиреостатик).

Методи

След попълване на личните данни във Въпросника, бременните жени са провели три групи изследвания:

1. *Определяне обема на щитовидната жлеза и евентуални структурни промени (огнищни и дифузни) сред изследваните бременни жени:* Освен палпация на шийната област обемът на щитовидната жлеза е определен чрез ултрасонографско изследване с Digital Color Doppler Diagnostic Scanner, C5 Ex (Shenzhen Landwind Medical Industry,

China). Използвана е стандартна формула за определяне на обема на щитовидната жлеза, представен в mL (23, 24). За българска популация според изследванията на М. Боянов (25) е приет норматив за среден обем на щитовидната жлеза при здрави жени (15-74 г. възраст) от 12,4±3,34 mL (9,06–15,74 mL). В поданализа според възрастта за групата 20-29 г. тиреоидният обем средно е 11,73 mL (медиана 11,58 mL), а за възрастта 30-44 г – 13,6 mL (медиана 12,93 mL). Авторът допълнително е анализирал възпроизводимостта при ехографско измерване на размерите и тиреоидния обем и е стигнал до извода, че коефициентът на вариация (CV, cm3) при две измервания от един изследвател е 1,59 mL. През 2017 г. в Атласа по тиреоидна ултрасонография е посочена горната граница за обем при жени <17,4 mL, а Световната здравна организация (СЗО) предлага за нормален тиреоиден обем при жени 4,4-18 mL (26, 27)

Близки са данните и на изследователи от Словения. Те сравняват обема на щитовидната жлеза в хода на бременността, 4 месеца след раждането и 14 месеца по-късно. Именно в този късен период след раждането, те представят тиреоиден обем 7,8±2,4 mL или в диапазона 5,4 до 10,2 mL (28).

Отново ще подчертаем, че многократно различни автори са изтъквали основния недостатък на ехографската волуметрия – ниска възпроизводимост на резултатите (29). Имайки предвид всички тези данни, ние се съобразихме със СЗО и приехме долна граница за обем на щитовидна жлеза при жени 4,4 mL, а за горна граница – 18 mL. Именно тези референтни граници послужиха като основа за оценка на връзката на обема на щитовидната жлеза с някои фактори, като размер на UIC, триместър, поредна бременност, наличие на ТРОАв(+), ниво на TSH, новооткрит хипотиреоидизъм, наличие на възлестна гуша.

2. *Лабораторният анализ* на всички кръвни проби е проведен в една централна лаборатория в деня на вземане на кръвната проба сутрин на гладно. В серум са изследвани количествено на анализатор Cobas e601: TSH с ECLIA метод тип сандвич (референтни граници 0,27-4,2 mIU/L); FT₄ с компетитивен ECLIA метод (референтни граници 9,3-17,0 pg/L), както и ТРОАв с компетитивен ECLIA метод (референтни граници <34 IU/mL).

3. *Определяне на уринната йодна концентрация.* Всяка бременна жена е дала порция сутрешна средна струя прясна урина ~20 mL в чиста пластмасова чаша за определяне на йодната концентрация. Пробите веднага са транспортирани на стайна температура в неутрални монокувети до Централна лаборатория (съгласно инструкциите при транспорт на стайна температура

за време под 8 часа, няма промяна в качеството на пробата). Всички аликвоти на уринни проби са замразени на -20°C до анализа им. На следващия ден замразените проби са транспортирани в специални контейнери до акредитираната лаборатория Limbach laboratory в Heidelberg, Germany. Анализът е направен чрез акредитиран метод на индуктивна куплирана плазмена мас спектрометрия (ICP-MS) със следните характеристики: linearity in the range of 0 – 4000 µg/L, precision in the series at 304 mcg/L RSD 0,8%, inter-assay SNU = 304 µg/L, 15 shifts, RSD 4,5%; accuracy percentage deviation from adjusted nominal value of the certified reference material Seronorm™ Trace Elements urine (SNU) (304 µg/L): 4,0% (data set = 4x12), recovery 104%. Резултатите са представени в µg/L.

Статистическият анализ е проведен със стандартен пакет SPSS 13,0 за Windows: дескриптивен анализ (средна стойност, стандартно отклонение, медиана), корелационен анализ и анализ на вариациите (ANOVA, post-hoc test – с Bonferroni alpha correction), използвани са параметричен и непараметричен методи – Chi-Square Test, Fisher's Exact Test, Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk Tests, Levene's Test for Equality of Variances, Student's t-test, Kruskal-Wallis test и Mann-Whitney test. Всички количествени променливи са представени като средно със стандартно отклонение или процент, р стойността под 0,05 е приета като статистически сигнификантна.

Резултати

Най-напред се определи средният тиреоиден обем на изследваните 547 бременни жени – 8,94±2,62 mL, медиана – 8,65, минимум 0,26/максимум 23,04; (25^{му} перцентил – 7,23, 50^{му} перцентил – 8,65, 75^{му} перцентил – 10,37). Установи се, че при общо 15 (2,73%) бременни жени има отклонение в обема на щитовидната жлеза, според приетите нормални граници – от 4,4 до 18 mL. От тях с намален обем на щитовидната жлеза са 11 бременни жени (2%), като само две от тях са оперирани преди бременността и се открояват от останалите от тази група с твърде малък тиреоиден обем – 0,26 и 1,43 mL. Останалите 9 бременни жени са с тиреоиден обем от 3,28 до 4,27 mL. При 4 бременни жени (0,73%) се установи увеличен тиреоиден обем – от 20,18 до 23,04 mL. При една от тях е налице активно аутоимунно заболяване с клиничен хипертиреоидизъм, при две жени – йоден дефицит и възли на щитовидната жлеза, а четвъртата беше най-възрастната от групата – на 42 г. и без тиреоидна патология.

Така, нормален обем на щитовидната жлеза се установи при останалите 532 (97,25%) бременни жени. Това може да бъде свързано с установеното нормално средно ниво на UIC за цялата група бременни жени – 181,60±93,97 µg/L, респ. на медианата на UIC (mUIC) – 170 µg/L (95% CI: 161-177). В анализа е разгледано влиянието на фактор размер на йодурия върху тиреоидния обем.

Преди настъпване на бременността 9 (1,6%) от жените са претърпели операция на щитовидната жлеза – 3 по повод на еутиреоидна възлеста гуша и 6 по повод на тиреотоксикоза при аутоимунно тиреоидно заболяване. Четири от оперираните бременни жени са на заместващо лечение с Левотироксин при аутоимунно тиреоидно заболяване, като само в един случай е постигнато еутиреоидно състояние. Две от тях са с най-малък тиреоиден остатък (обем 0,26 mL и 1,43 mL) и, въпреки заместващото лечение, са в хипотиреоидно състояние. Останалите 5 жени след оперативното лечение са без Левотироксин и са в еутиреоидно състояние, като 3 са оперирани за възлеста гуша. Средният тиреоиден обем при цялата група от 9 жени, претърпяли предвартелно оперативно лечение на щитовидната жлеза, е 6,88±4,13 mL; медиана 8,18, минимум 0,26/максимум 12,10 (25^{му} перцентил – 3,27, 50^{му} перцентил – 8,18, 75^{му} перцентил 10,12).

Останалите 538 бременни жени без оперативно лечение на щитовидната жлеза са със среден тиреоиден обем 8,97±2,56 mL; медиана 8,65, минимум 3,28/максимум 23,04 mL (25^{му} перцентил – 7,24, 50^{му} перцентил – 8,65, 75^{му} перцентил 10,37). Данните за трите групи (обща, оперирани и неоперирани) са представени в Таблица 1 (Табл. 1).

При сравнението в тиреоидния обем на двете групи с и без оперативно лечение преди настоящата бременност не се доказва значима разлика (NS). Както се вижда медианите са твърде близки и освен това е незначителен броят на бременните жени (само 9) с предшестващо оперативно лечение на щитовидната жлеза. Идентичните данни и при липса на значима разлика за цялата група от 547 жени и групата от 538 неоперирани жени позволява да се разглежда тиреоидният обем за цялата група от 547 по отношение връзката му с други фактори.

Анализ на факторите, които оказват влияние върху тиреоидния обем.

1. Уринна йодна концентрация (UIC)

Ролята на UIC върху нивото на TSH и тиреоидния обем беше изследвана при трите основни нива на UIC – ниска (≤149 µg/L), нормална (150-249 µg/L) и над-оптимална (250-497 µg/L), като не се

установи значима разлика между показателите при трите нива на UIC (Табл. 2).

2. Поредност на триместъра

В хода на бременността обичайно обемът на щитовидната жлеза нараства, което се представя в Таблица 3. Чрез тест на Kruskal-Wallis се установи значима разлика в обема на щитовидната жлеза между първи и трети триместър (8,42±2,55 mL срещу 9,31±2,80 mL, p<0,011). Доказа се и корелация между тиреоиден обем и пореден триместър (p<0,014) (Табл. 3).

3. Поредност на бременността

Изследва се доколко поредността на бременността има значение за обема на щитовидната жлеза. Установи се, че 245 (44,8%) от жените са с първа бременност, а останалите 302 (55,2%) се разпределят между втора бременност – 216 (39,5%), трета бременност – 57 (10,4%), четвърта 19 (3,5%) и пета, респ. шеста поредни бременности – 10 (1,8%). Обемът на щитовидната жлеза беше значимо по-малък при жени в първа бременност в сравнение с всички останали поредни бременности – 8,67±2,23 mL, медиана 8,35 mL срещу 9,15±2,85 mL, медиана 8,96 mL (p<0,01) (Фиг. 1).

4. Други фактори – ТРОАб(+), новооткрит хипотиреоидизъм, новооткрита възлеста гуша

Установи се значимо по-голям тиреоиден обем при 55^{ме} бременни жени с ТРОАб(+) – 10,17±3,67 mL, медиана – 10,12 (минимум 1,43/максимум 23,04) в сравнение с 492^{ме} бременни с ТРОАб(-) – 8,80±2,42 mL, медиана – 8,42 (минимум 0,26/максимум 21,03), p<0,002. При новооткрит хипотиреоидизъм тиреоидният обем е значимо по-малък в сравнение с известния – 8,44±2,34 mL, медиана 7,97 (минимум 3,89/максимум 17,47) срещу 9,13±2,68 mL, медиана 8,92 (минимум 0,26/максимум 23,04), p<0,001.

Констатира се, че тиреоидният обем е значимо по-голям при новооткрита възлеста гуша в сравнение с известна (9,77±2,81 mL, медиана 9,33 – 4,96-20,26 срещу 8,73±2,51 mL, медиана 8,34, 0,26-23,04, p<0,001), както и при бременни жени с повече от един възел в сравнение с единичен (11,39±3,18 mL, медиана 11,15, 6,55-20,26 срещу 8,77±2,48 mL, медиана 8,40, 0,26-23,04, p<0,001).

При ултрасонографския преглед се установиха възли на щитовидната жлеза (≥ 5 mm) при 119 бременни жени или честота 21,75%. Само при 8 бременни жени (6,7%) образуването е било известно още преди настоящата бременност, а останалите 111 (93,3%) бременни жени се оказват с новооткрита възлеста гуша. Именно при тези бременни жени за първи път по време на скрининга се прави ултрасонографско изследване на щитовидната жлеза. Фамилност за тирео-

Таблица 1. Тиреоиден обем за цялата група, с и без тиреоидна операция преди бременността.

	Обем на щитовидна жлеза общо за цялата група, 547 (100%) бременни жени	Обем на щитовидна жлеза с предшестваща операция на щитовидната жлеза, 9 (1,6%) бременни жени	Обем на щитовидна жлеза без предшестваща операция на щитовидната жлеза, 538 (98,4%) бременни жени
Средно ниво	8,94	6,88	8,97
Стандартно отклонение	2,62	4,13	2,56
Медиана	8,65	8,18	8,65
Минимум	0,26	0,26	3,28
Максимум	23,04	12,10	23,04
Персентили	25	7,23	3,27
	50	8,65	8,18
	75	10,37	10,12

Ниво на UIC	Индикатор	TSH (mIU/L)	Обем на щитовидната жлеза (mL)	
0-149 µg/L	брой	221	221	
	Средно ниво	Средно ниво	2,6	9,08
		Стандартно отклонение	1,43	2,70
		Медиана	2,46	8,70
		Минимум	0,05	1,43
		Максимум	9,89	21,03
150-249 µg/L	брой	211	211	
	Средно ниво	Средно ниво	2,92	8,88
		Стандартно отклонение	2,32	2,69
		Медиана	2,49	8,56
		Минимум	0,02	0,26
		Максимум	24,15	23,04
250-497 µg/L	брой	115	115	
	Средно ниво	Средно ниво	2,77	8,77
		Стандартно отклонение	1,33	2,26
		Медиана	2,60	8,65
		Минимум	0,32	3,89
		Максимум	7,22	18,38

Таблица 2.

Ниво на TSH и тиреоиден обем при трите основни нива на UIC (NS).

одно заболяване е установена при 29/119 (24,4%) от бременните жени с образувания на щитовидната жлеза.

При 6% от бременните жени (33/547) има повече от едно образувание и понякога те са с различна структурна характеристика, както следва: кисти – 68 (12,4%), смесен – 41 (7,5%), солиден – 21 (3,8%), хипоехогенен – 6 (1,1%). Както се вижда най-голям е дялът на кистозните възли (12,4%), следвани от смесените (7,5%).

Разпределението по функционален статус при възлеста гуша показва, че 23,5% са с хипотиреоидизъм – 28 бременни жени (20 със субклинически хипотиреоидизъм и 8 с клинически хипотиреоидизъм). Само 4 бременни жени (3,3%) са с хипертиреоидизъм, а 10 бременни жени (8,4%) са с low T₄-синдром, като останалите 78 (65,6%) са с нормална функция на щитовидната жлеза.

Установи се слаба корелация между наличието на възли в щитовидната жлеза и нивото на TSH (Spearman's rho=0,139, p<0,01), както и между новооткрита възлеста гуша и TSH (Spearman's rho=0,089, p<0,038).

Таблица 3. Динамика на тиреоиден обем при жени в различен срок на бременността.

Триместър	Брой	Средно ниво	Стандартно отклонение	Медиана	Минимум	Максимум
Първи	110	8,42*	2,55	7,98	1,43	17,20
Втори	276	8,92	2,47	8,74	0,26	23,04
Трети	161	9,31*	2,80	9,00	4,08	21,03
Общо	547	8,94	2,60	8,65	0,26	23,04

* $p < 0,011$



Фигура 1.

Обем на щитовидната жлеза според поредността на бременността.

Само при 14 бременни жени (11,8%) с възлеста гуша се намериха и ТРОАб(+). Тези антитела се срещат в $\frac{3}{4}$ от случаите при бременни жени с дифузни структурни промени в щитовидната жлеза и само в $\frac{1}{4}$ от случаите са налице при огнищни промени.

Анализът за връзката между тиреоиден обем и ниво на ТРОАб показва, че значимо по-малък е обемът при ТРОАб(-) в сравнение с ТРОАб(+) бременните жени – $8,80 \pm 2,42$ mL, медиана 8,42 (0,26-21,03) срещу $10,17 \pm 3,67$ mL, медиана 10,12 (1,43-23,04), $p < 0,002$. Доказа се и значима корелация между тиреоиден обем и наличието на ТРОАб(+) – $p < 0,02$.

Направи впечатление, че честотата на случаите с ТРОАб(+) е различна в трите триместра и докато в първи и втори триместър е около 10-12%, то в трети триместър е налице значимо намаление на ТРОАб(+) в сравнение с втори триместър – 6,8% (11/161) срещу 11,96% (33/276), $p < 0,05$. При бременните жени с хипотиреоидизъм ТРОАб(+) са налице в 28,2% (22/144), докато при еутиреоидните бременни – в 9,1% (32/350) т.е. 3 пъти по-рядко, $p = 0,057$.

Проведе се допълнителен анализ на две подгрупи бременни жени – Група 1 (320 „тиреоидно

зdrави“, 58,5%), от която бяха изключени жените с тиреоидна дисфункция, с ТРОАб(+), както и прилагащите медикаменти с ефект върху функцията на щитовидната жлеза (30) и Група 2 (227 „тиреоидно болни“, 41,5%). Изследва се отново връзката между тиреоидния обем и факторите, които оказват влияние върху него в двете подгрупи и се направи сравнение между тях.

Роля на йодурията

Нивото на UIC в двете подгрупи бременни жени – Група 1 „тиреоидно здрави“ и Група 2 „тиреоидно болни“ е представено в Таблица 4 (Табл. 4).

Установи се, че няма значима разлика между двете подгрупи по отношение на йодурията (Група 1 – $174,8 \pm 90,1$ $\mu\text{g/mL}$ срещу Група 2 – $191,3 \pm 98,7$ $\mu\text{g/mL}$, NS), като и в двата случая йодурията е в рамките на приетите нормални нива (150-249 $\mu\text{g/mL}$). Не се установи и значима разлика и в нивото на UIC между общата група и всяка една от подгрупите (NS). В същото време направеното сравнение в тиреоидния обем на двете подгрупи бременни жени установи значима разлика (Група 1 – $9,16 \pm 2,44$ mL срещу Група 2 – $8,62 \pm 2,79$ mL, T-6,223, $p < 0,001$). Следователно, при незначимо

по-ниска йодурия е налице значимо по-голям тиреоиден обем при бременните жени без тиреоидна патология в сравнение с тези с налична такава (Табл. 5).

Роля на поредността на триместъра

Изследва се ролята на поредността на триместъра при двете подгрупи и се установи, че тиреоидният обем е значимо по-голям само в първи триместър при Група 1 ($n=62$) в сравнение с Група 2 ($n=48$) – $8,90 \pm 2,40$ mL, медиана 8,62, (3,68-15,33) срещу $7,8 \pm 2,64$ mL, медиана 7,58 (1,43-17,20), $p < 0,0015$. Това означава, че тиреоидеята нараства значимо повече през първия триместър при бременните жени без тиреоидна патология в сравнение с тези с налична. Трябва да се отбележи, че през втори и респективно трети триместър не се установи значима разлика в тиреоидните обеми между двете подгрупи.

Обсъждане

Тиреоидният обем по време на бременност се повлиява от различни фактори – йодно заместване, генетични фактори, възраст, TSH, антропометрични параметри, брой раждания, тютюнопушене (31). Zaletel G (2011 г.) допуска, че увеличението на щитовидната жлеза по време на бременност и обратното ѝ намаление след раждане могат да бъдат свързани с повишено кръвоснабдяване на тиреоидеята по време на бременност (32). Общоприетите основни стимулатори на растежа на щитовидната жлеза по време на бременност са TSH, hCG и йодният дефицит (33).

В настоящата работа ние установихме, че средното ниво на тиреоидния обем, както и на TSH не се различават значимо при трите нива на UIC. Подобна е констатацията и на Shi X и сътр.

Таблица 4. Средни стойности и медиана на UIC в общата група, както и в двете подгрупи (Група 1 и Група 2).

Групи бременни жени	Средно ниво	Стандартно отклонение	Брой	Медиана	Минимум	Максимум
Група 1: 320 бременни жени	174,84	90,1	317	165	11	482
Група 2: 227 бременни жени	191,35	98,7	220	179	21	497
Общо: 547 бременни жени	181,61	93,9	537	170	11	497

Роля на поредната бременност

Намери се значимо по-голям тиреоиден обем при първа бременност за жените от Група 1 в сравнение с Група 2 – $9,01 \pm 2,09$ mL, медиана 8,59, (4,32-15,33) срещу $8,2 \pm 2,35$ mL, медиана 7,89, (0,26-14,11), $p < 0,005$. В същото време при поредна бременност (от 2^{ра} до 6^{ма} бременност) не се установи значима разлика между двете подгрупи (Група 1 – $9,29 \pm 2,68$ mL, медиана 9,10, (3,68-21,03) срещу Група 2 – $8,95 \pm 3,07$ mL, медиана 8,23, (1,43-23,04), NS).

Средният тиреоиден обем за Група 1 от 320 бременни жени е $9,16 \pm 2,44$ mL. Сред тях 69 жени имат възлеста гуша, чийто среден обем е $9,99 \pm 3,18$ mL, но е незначимо по-голям в сравнение с цялата група, NS. В същата Група 1 не се установи и значима разлика в тиреоидния обем при 49^{ме} жени с повече от един възел на щитовидната жлеза в сравнение с 20^{ме} случая с един възел – $11,21 \pm 3,81$ mL срещу $9,48 \pm 2,72$ mL, NS.

(2015 г.), които установяват, че ниското ниво на UIC няма ефект върху серумното ниво на TSH или FT₄ (34). Ние не установихме и значима корелация между UIC и тиреоидния обем, както и между UIC и нивото на TSH. Специално трябва да се отбележи, че медианата на UIC на изследваните 547 бременни жени е нормална и това поставя страната ни в групата на страните, ликвидирали йодния дефицит. Следователно, намерените нормални параметри в нашия материал – TSH и тиреоиден обем са пряк резултат на доказаната йодната достатъчност в страната. Трябва да се има предвид, че в друга наша работа беше документирано, че над 50% от изследваните бременни жени приемат допълнително поливитамини с минерали (в това число йодид $150 \mu\text{g/L}$) (35). Това се предприема по протокол на акушер-гинеколозите в нашата страна и очевидно е допълнителен фактор за добрите резултати в изследваната популация бременни жени. Така, докато 280 (51,2%) бременни жени под суплементация с

Таблица 5. Среден обем, респ. медиана на щитовидната жлеза в цялата група бременни жени, както и в Група 1 и Група 2.

Групи бременни жени	Средно ниво	Стандартно отклонение	Брой	Медиана	Минимум	Максимум
Група 1: 320 бременни жени	9.16	2.44	320	8.96	3.68	21.03
Група 2: 227 бременни жени	8.62	2.79	227	8.06	0.26	23.04
Общо: 547 бременни жени	8.94	2.60	547	8.65	0.26	23.04

витамини и минерали имат тиреоиден обем $7,89 \pm 2,12$ mL, то при 79 (14,4%) бременни жени без суплементация, обемът е $8,50 \pm 2,37$ mL, NS. Тук не се включени групи 188 жени, които приемат друг медикамент различен от витамини с минерали.

Словенски автори намират увеличение в обема на щитовидната жлеза в хода на бременността и разликата е значима между първи и трети триместър – $8,7 \pm 2,5$ mL срещу $11,3 \pm 3,1$ mL, $p < 0,001$ (28). Същата констатация прави и турски автор Özdikici M – $11,95 \pm 1,90$ mL срещу $17,20 \pm 1,2$ mL, $p < 0,01$ (36). Подобни са и нашите данни, които илюстрират значима разлика в тиреоидния обем между първи и трети триместър, $p < 0,011$.

Ние установихме още, че поредността на бременностите също оказва влияние върху тиреоидния обем, като се доказва значима разлика - тиреоиден обем при 245 жени с първа бременност срещу тиреоиден обем при останалите 302 бременни с поредна бременност – $8,67 \pm 2,23$ mL срещу $9,15 \pm 2,85$ mL, $p < 0,01$. Прави впечатление по-рязкото нарастване в тиреоидния обем при втора бременност в сравнение с първа, загържане в обема при трети и четвърта бременност и след нея следва нов подем в обема (Фиг. 1).

Park AE и сътр. намират, че над 18% от бременните жени имат положителни ТРОАб или ТgАб (37). По принцип, мнозина автори считат, че ТРОАб предсказват риск от развитие на хипотиреоидизъм (38, 39). В нашия материал също се доказва връзка между ТРОАб(+) и хипотиреоидизма. Оказва се, че значимо по-често прибременните жени с хипотиреоидизъм са налице ТРОАб(+) в сравнение с еутиреоидните бременни жени, $p = 0,057$. Значимо по-голям е и тиреоидния обем при бременните жени с ТРОАб(+) в сравнение с бременни жени с ТРОАб(-), $p = 0,002$. Така трите фактора се оказват много тясно свързани по между си.

Carleé A и сътр. установяват, че обемът на щитовидната жлеза при аутоимунен тиреоидит има Гаусово разпределение и при двата пола, но не е бимодален модел. Увеличен тиреоиден обем се наблюдава при лицата с по-високи тиреоидни ТРОАб, а по-малък обем при лицата с по-изразен хипотиреоидизъм (40). Нашата констатация е същата – значимо по-голям тиреоиден обем е налице при нашите бременни жени с ТРОАб(+) ($p < 0,002$) и значимо по-малък тиреоиден обем се намери при бременните жени с хипотиреоидизъм ($p < 0,001$).

Ние доказахме и силна зависимост между ТРОАб и ехографската структурна характеристика на щитовидната жлеза (хипоехогенност, нехомогенност), $p < 0,001$. Установиха се ехографски данни за хипоехогенност при 13,7% (75/547) и за нехомогенност при 21,6% (118/547) от бременните жени. Тези структурни характеристики се оказаха пряко свързани с нивото на ТРОАб. Докато при бременни жени с ТРОАб(+) хипоехогенност е налице в 36% (27/75) и нехомогенност в 34,7% (41/118), то при бременни жени с ТРОАб(-) хипоехогенност се установява в 5,9% (28/472) и нехомогенност в 3,3% (14/429). Разликите са силно значими и в двата случая, $p < 0,001$. Следователно е налице кратко по-висока честота на ТРОАб(+) при бременни жени с хипоехогенна респ. нехомогенна ехографска структурна характеристика на щитовидната жлеза.

Клетъчно-медицираният и хуморалният имуноен отговор са атенюирани по време на бременността. Имуният отговор е изместен към хуморалния имунитет и така се развива имунна толерантност към тъканите на плода. Поради тази причина в хода на бременността нивата на ТРОАб и ТgАб намаляват, като достигат най-ниските стойности в третия триместър (41, 42). Прави впечатление и в нашия материал, че честотата на случаите с ТРОАб(+) е различ-

на през трите триместъра и докато през първи и втори триместър е около 10-12%, то в трети триместър е налице значимо намаление на ТРОАб(+) в сравнение с втори триместър – 6,8% (11/161) срещу 11,96% (33/276), $p < 0,05$.

Анализът на двете подгрупи (Група 1 и Група 2) не показва различие в тиреоидния обем на всяка от тях с този на цялата група от 547 бременни жени (NS). Значимо по-голямото нарастване в тиреоидния обем при 320 бременни жени без тиреоидна патология в сравнение с 227 бременни жени с тиреоидна патология, при условие, че липсва значима разлика в нивото на UIC, ни накара да се съгласим с хипотезата на Berghout A и Wiersinga W (15). Всъщност, обемът и функцията на щитовидната жлеза по време на бременност се адаптират по физиологичен път за посрещане на повишените нужди от йод и енергия.

Заключение: Глобално през последните 25 г. настъпи подобрение в йодния статус и това доведе до подобрение в здравето и икономическо състояние на населението основно в страните с нисък и среден доход (43). Това е основният фактор, който оказва влияние върху тиреоидния обем. При бременните българки в над 97% от случаите тиреоидният обем е нормален и пряко отразява нормалното средно ниво на UIC и mUIC при тях. Допълнителният прием на комбинирани витамини с минерали (в това число йодид 150 $\mu\text{g/L}$) се явява важен фактор за добрите резултати в изследваната популация бременни жени.

Лекото увеличение на тиреоидния обем в хода на бременността най-вероятно е израз на физиологична адаптация в отговор на лек йоден дефицит в този период на повишени нужди.

По принцип зрабеопазната система трябва да съсредоточи усилията си в поддържането на това постижение на универсалното йодно заместване, за да се предотвратяват йод-дефицитните нарушения. Бременните жени заедно с децата са най-чувствителната част от популацията, за които грижите в този аспект са наша първостепенна грижа.

Благодарности:

Авторите благодарят на 104 ендокринолози и акушер-гинеколози, които подкрепиха проекта: В. Йотова (Троян), С. Димитрова (Габрово), Анчев (Габрово), Митев (Габрово), А. Попов (Гоце Делчев), А. Андреев (Самоков), Е. Апостолова (Смолян), М. Хубчев (Смолян), С. Димитров (Пиргон), Р. Наумовска (Плевен), М. Мануелиан (Бургас), К. Кироваков (Бургас), Т. Габровска (Бургас), М. Ангелова (Стара Загора), К. Венкова (София), Р. Велев (София), И. Сигридов (София), Б. Богослорова (София) ... общо 104 специалисти от страната.

Техническа подкрепа: Т. Корнилова (София), З. Методиева (София), Ю. Георгиева (София), Х. Атанасова (Бургас), Л. Илиева (Стара Загора).

Changes in the Volume and Structure of the Thyroid Gland, Thyroid Autoimmunity in Pregnant Women – Bulgarian data from 2019

Borissova, Anna-Maria I.^{1,2}, Ivanova, Lyudmila B.², Trifonova, Boyana C.^{1,2}, Dakovska, Lilia N.¹, Mikhailova, Eugenia N.¹, Vukov, Mircho I.¹

¹Clinic of Endocrinology, „Sofiamed“ University Hospital, Sofia, Bulgaria

²Faculty of Medicine, Sofia University „St. Kliment Ohridski“, Sofia, Bulgaria

Address for correspondence:

Prof. Anna-Maria Borissova, PhD, DMedSci,
University Hospital „Sofiamed“, Faculty of Medicine,
Sofia University „St Kliment Ohridski“
Sofia-1750, Dimitar Mollov 10
e-mail: anmarbor@abv.bg

Submitted: 13. 07. 2020

Revised: 11. 10. 2020

Accepted: 18. 10. 2020

Abstract

In general, pregnancy can develop in conditions of mild iodine deficiency due to high needs during this period and this can be observed even in areas with iodine sufficiency.

The aim of the study is to look for the relationship between thyroid volume and pregnancy-specific factors, as well as to determine the frequency and nature of structural thyroid changes in pregnant women.

Material: 547 pregnant women, mean age 30±5 years, were examined. First pregnancy was found in 245 (45.1%) and sequence of pregnancy in 302 (54.9%) pregnant women.

Methods: Ultrasonographic calculation of thyroid volume according to a standard formula; Determination of the level of TSH, FT₄, TPOAb by ECLIA method; Measurement of urinary iodide concentration (UIC) by an accredited method of inductive coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

Results: Over 97% of pregnant women have a normal thyroid volume – 8,94±2,62 mL, which is related to the normal mean UIC level – 181,60±93,97 µg/L resp. median UIC (mUIC) – 170 µg/L (95% CI: 161-177). During pregnancy thyroid volume increased (first trimester 8,42±2,55 mL vs third 9,31±2,80 mL, p<0,011). In the first pregnancy the thyroid volume was smaller compared to the volume in sequence of pregnancy – 8,67±2,23 mL vs 9,15±2,85 mL, p<0,01. Thyroid volume in 55 pregnant women with TPOAb(+) was significantly higher compared to 492 pregnant women with TPOAb(-) – 10,17±3,67 mL vs 8,80±2,42 mL, p<0,002. It turns out that the thyroid volume is significantly higher in the newly discovered nodular goiter – 9,77±2,81 mL vs 8,73±2,51 mL, p<0,001, as well as in pregnant women with more than one node – 11,39±3,18 mL vs 8,77±2,48 mL, p<0,001. Thyroid nodules (mainly cystic) are present in 21,75% of pregnant women, with only 6,7% being known.

Conclusion: The thyroid volume in pregnant Bulgarian women is in over 97% of cases normal and directly reflects the established normal mean ioduria in them. Its slight increase during pregnancy is an expression of physiological adaptation in response to mild iodine deficiency in this period of increased needs.

Key words: thyroid volume, trimester, sequence of pregnancy, TPOAb(+), nodes

Introduction

Studies on urinary iodine concentration (UIC) in pregnant women in Bulgaria were conducted in 1999 (Varna, 180 women) (1), 2001 (Sofia, 51 women) (2), 2003 (national, 355 women) (3), 2008 (national, 150 women) (4). With the exception of the 1999 study, the rest included pregnant women from the second and third trimesters only. The results of these studies were analyzed by Ivanova L et al. in 2013 (5). The authors summarize that the median iodine of pregnant women in Bulgaria is at the lower limit of the reference range, which indicates low iodine intake and probably this is a result of deliberately limiting salt consumption, a relatively low standard of iodization and lack of additional supplementation with iodine preparations in a significant proportion of pregnant women.

This very long interval of 12 years, in which no screening of the iodine and thyroid status of pregnant Bulgarian women was made, necessitated the organization and implementation of a systematic study of this important part of the population, which has a very high medical and social significance.

The present analysis presents a very small section of a comprehensive population-based study, focusing mainly on changes in thyroid volume as well as structural changes in the thyroid gland (focal and diffuse) of pregnant women.

Pregnancy affects the volume of the thyroid gland as well as its function. In countries with iodine sufficiency thyroid volume has been found to increase by about 10% during pregnancy, and in areas with iodine deficiency, the volume increases by 20-40% (6). As early as 1921, Marine D and Kimball PO noted that goiter formation during pregnancy is the result of iodine deficiency and this can be prevented by iodine intake (7). The Preamble to the monograph *Iodine Deficiency Disorders and Their Elimination* 2017, edited by Elizabeth N. Pearce (8) cites the publication of Clements FW et al, 1960 (9) – „... les aspects pratiques de la lutte contre le goitre endémique, ainsi que la législation de la prophylaxie par l'iode...” and on behalf of the WHO, the question of extremely simple and inexpensive iodine prevention of endemic goiter is raised. In general, pregnancy can develop in conditions of mild iodine deficiency due to high needs during this period and this can be observed even in areas with iodine sufficiency. It is this iodine deficiency, according to Hintze G et al. (1991), an increase in TSH is the cause of thyroid enlargement in pregnant women (10).

Rasmussen et al. (1989) found an increase in thyroid volume during pregnancy – from 20,2±2,0 mL in the second trimester to 24,1±2,2 mL in the

third trimester, while no change in TSH levels was detected during pregnancy (11). The question remains whether the increase in thyroid volume during pregnancy reflects physiological adaptation in areas with mild iodine deficiency or whether it is a pathological condition associated with iodine deficiency. Normal thyroid volume is a function of iodine intake is emphasized by Berghout A et al. (12).

The main stimulators of thyroid growth during pregnancy are TSH, human chorionic gonadotropin (hCG) and iodine deficiency. During pregnancy TSH is kept within its normal limits (13) and thyroid volume correlates with TSH levels. This hormone decreases in the first trimester and returns to pre-pregnancy levels in the third trimester (14). Given the changes in the course of pregnancy in the level of TSH within its normal limits, we must assume that thyroid volume is unlikely to be affected by TSH.

In areas with iodine sufficiency, thyroid volume does not increase during pregnancy, despite high hCG levels in the first trimester, but TSH levels are low at this time. In areas with iodine deficiency, the volume of the thyroid gland increases and this is probably related to the autoregulatory mechanisms of iodine on the growth of the thyroid gland (15). Berghout A and Wiersinga W made a systematic analysis of the volume and function of the thyroid gland during pregnancy and conclude that in fact the volume and function of the thyroid gland during pregnancy are physiologically adapted to meet the increased needs for iodine and energy (15).

The incidence of nodular goiter in healthy individuals (without pregnancy) diagnosed after ultrasonography ranges between 17-23% in regions with borderline iodine deficiency (16). With age, the incidence of nodular goiter in both sexes increases (women: 20-46%, men: 7-23%) (17). In pregnant women, the incidence of nodular goiter proven after ultrasonography is 25% (18).

The reasons for the formation of thyroid nodules are numerous and include, like iodine deficiency supporting chronic stimulation of the TSH receptor, as well as other factors – mutations in this receptor, stimulation by hCG during pregnancy, the activity of various growth factors (IGF-1, epidermal growth factor). Most of these stimuli can exist during pregnancy, and this explains why thyroid nodules grow during this period (19).

Our population study of 2012 (men and women, 20-80 years of age) found an incidence of nodular goiter in 24.4%, with 32,1% in women and 15,7% in men, $p < 0,001$. It turned out that in young women (20-29 years of age) the incidence of nodular goiter is 16%, and in over 70 years of age is 45%, i.e. almost 3 times more often (20).

The three main indicators that are associated with the presence of iodine deficiency are: UIC, TSH level and thyroid volume. In first place is UIC, but all three parameters are closely related to each other (21). Therefore, when screening the condition of the thyroid gland in pregnant women, the algorithm includes all three parameters – UIC assessment, determination of TSH level and ultrasonographic examination of the thyroid gland to measure its volume, as well as to determine the possible presence of structural changes (focal and diffuse).

The aim of the study was to look at the relationship between thyroid volume and pregnancy-specific factors in a cross-sectional multicenter population-based study, to determine the frequency and nature of structural thyroid changes in pregnant women, and the extent to which volume and structural changes are related to thyroid autoimmune.

Study design

A cross-sectional multicenter population-based study was conducted from September 25 to November 6, 2019 in 10 regions of Bulgaria (Sofia, Sofia region – Pirdop, Samokov; Smolyan; Gotse Delchev; Gabrovo; Troyan-Apriltsi; Burgas; Stara Zagora; Pleven), including small towns and villages from each region or a total of 84 settlements. Regions with a known iodine deficiency in the past were selected – Sofia and the district, Smolyan, Gotse Delchev, Gabrovo, Troyan, as well as regions with iodine sufficiency – Burgas, Stara Zagora, Pleven and their districts. The study was conducted with the support of 104 endocrinologists and gynecologists from these regions. From the dispensary list of registered pregnant women, 630 pregnant women were invited to participate, 86,8% of them or 547 women responded.

Material

We screened 547 pregnant women, mean age 30 ± 5 years, median 30 years (18-47 years) – 40% (28-32 years), 23,4% (33-37 years), 21% (23-27 years), 8,4% (38-42 years), 6% (18-22 years) and 1,1% (43-47 g). According to the trimester, the pregnant women were distributed as follows: first – 110 (20,10%), second – 276 (50,45%) and third – 161 (29,43%).

All the pregnant women were Caucasian, with no evidence of liver, kidney disease, or evidence of malabsorption. The participants signed an informed consent, confirmed by the local Ethics Commission at „Sofamed“ University Hospital, Sofia University „Saint Kliment Ohridski“, and it was prepared in agreement with the ethical standards according to the Helsinki Declaration-1964 and its later additions (22).

Each pregnant woman filled in a Questionnaire

personally with the help of a specially designated medical person from the face-to-face team in order to correctly collect data on pregnancy history, intake of combined vitamins with minerals, vitamin D, other medications by type and doses available, thyroid or other diseases. According to the data from the Questionnaire, it was clarified that 245 (44,2%) women had a first pregnancy, 216 (39,5%) – a second, 57 (10,4%) – a third, 19 (3,5%) – a fourth and 10 (1,8%) – fifth resp. sixth sequence of pregnancy.

Surgical treatment of the thyroid gland before the current pregnancy was performed in 9 (1,6%) pregnant women. Thyroid dysfunction was found in 151 (27,6%) pregnant women – 144 (26,3%) with hypothyroidism, 7 (1,3%) with hyperthyroidism, and 77 (14,07%) were undergoing thyroid therapy (76 with Levothyroxine and 1 with thyrostatic).

Methods

After filling in the personal data in the Questionnaire, three groups of tests were conducted on the pregnant women:

1. *Determination of thyroid volume and possible structural changes (focal and diffuse)* among the examined pregnant women: In addition to palpation of the cervical region, the volume of the thyroid gland was determined by ultrasonographic examination with Digital Color Doppler Diagnostic Scanner, C5 Ex (Shenzhen Landwind Medical Industry, China). A standard formula was used to determine the volume of the thyroid gland presented in mL (23, 24). For the Bulgarian population, according to the research of Boyanov M (25), a standard for average thyroid volume in healthy women (15-74 years of age) of $12,4 \pm 3,34$ mL (9,06–15,74 mL) was adopted. In the subanalysis according to age for the group 20-29 years, the thyroid volume averaged 11,73 mL (median 11,58 mL), and for the age group 30-44 g – 13,6 mL (median 12,93 mL). The author further analyzed the reproducibility in ultrasound measurement of size and thyroid volume and concluded that the coefficient of variation (CV, cm³) in two measurements by one researcher was 1,59 mL. In 2017, the Atlas of Thyroid Ultrasonography indicated an upper limit for volume in women <17,4 mL, and the World Health Organization (WHO) proposed for normal thyroid volume in women 4,4-18 mL (26, 27).

The data of researchers from Slovenia are also close. They compare the volume of the thyroid gland during pregnancy, 4 months after birth and 14 months later. It is in this late period after birth that they present a thyroid volume of $7,8 \pm 2,4$ mL or in the range of 5,4 to 10,2 mL (28).

We will stress again that many different authors

have repeatedly pointed out the main disadvantage of ultrasound volumetry which is the low reproducibility of the results (29). With all these data in mind, we complied with the WHO and adopted a lower limit for thyroid volume in women of 4,4 mL and an upper limit of 18 mL. These reference limits served as a basis for assessing the relationship of thyroid volume with certain factors, such as UIC size, trimester, sequence of pregnancy, presence of TPOAb (+), TSH level, newly diagnosed hypothyroidism and the presence of nodular goiter.

2. *The laboratory analysis of all blood samples* was performed in a Central laboratory on the day of the blood sample in the morning on an empty stomach. Serum was quantified on a Cobas e601: TSH analyzer with ECLIA sandwich method (reference range 0,27-4,2 mIU/L); FT₄ with competitive ECLIA method (reference limits 9,3-17,0 ng/L), as well as TPOAb with competitive ECLIA method (reference limits <34 IU/mL).

3. *Determination of urine iodine concentration.* Each pregnant woman gave a portion of morning medium stream of fresh urine ~20 ml in a clean plastic cup to determine the iodine concentration. Samples were immediately transported at room temperature in neutral monocuvettes to a Central Laboratory (according to the instructions for transport at room temperature for less than 8 hours, no change in sample quality). All aliquots of urine samples were frozen at -20°C until analysis. The next day, the frozen samples were transported in special containers to the accredited Limbach laboratory in Heidelberg, Germany. The analysis was performed by an accredited inductive coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method with the following characteristics: linearity in the range of 0 - 4000 µg/L, precision in the series at 304 µg/L RSD 0,8%, inter-assay SNU = 304 µg/L, 15 shifts, RSD 4,5%; accuracy percentage deviation from adjusted nominal value of the certified reference material Seronorm™ Trace Elements urine (SNU) (304 µg/L): 4,0% (data set=4x12), recovery 104%. The results are presented in µg/L.

Statistical analysis was performed with the standard package SPSS 13.0 for Windows: descriptive analysis (mean, standard deviation, median), correlation analysis and analysis of variations (ANOVA, post-hoc test - with Bonferroni alpha correction), parametric and nonparametric methods were used - Chi-Square Test, Fisher's Exact Test, Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk Tests, Levene's Test for Equality of Variances, Student's t-test, Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney test. All quantitative variables are presented as standard deviation or percentage, p value below 0,05 is considered statistically significant.

Results

First, the mean thyroid volume of the 547 pregnant women examined was determined - $8,94 \pm 2,62$ mL, median - 8,65, minimum 0,26/maximum 23,04; (25th percentile - 7,23, 50th percentile - 8,65, 75th percentile 10,37). It was found that in a total of 15 (2,73%) pregnant women there was a deviation in the volume of the thyroid gland, according to the accepted normal limits - from 4,4 to 18 mL. Of these, 11 pregnant women (2%) with reduced thyroid volume, two of them were operated before pregnancy, and stand out from the rest of this group with a too small thyroid volume - 0,26 and 1,43 mL. The remaining pregnant women had a thyroid volume of 3,28 to 4,27 mL. In 4 pregnant women (0,73%) increased thyroid volume was found - from 20,18 to 23,04 mL. In one of them there is an active autoimmune disease with clinical hyperthyroidism, in two women - iodine deficiency and thyroid nodules, and the fourth was the oldest in the group - 42 of age and without thyroid pathology. Thus, normal thyroid volume was found in the remaining 532 (97,25 %) pregnant women. This may be related to the established normal mean urinary iodine concentration (UIC) for the whole group of pregnant women - $181,60 \pm 93,97$ µg / L, as well as the median UIC (mUIC) - 170 µg/L (95% CI: 161-177). The analysis examines the influence of ioduria size factor on thyroid volume.

Before pregnancy, 9 (1,6%) women underwent thyroid surgery - 3 for euthyroid goiter and 6 with thyrotoxicosis in autoimmune thyroid disease. Four of the operated pregnant women are on Levothyroxine replacement therapy for autoimmune thyroid disease, with only one case achieving euthyroid status. Two of them had the smallest thyroid residue (volume 0,26 mL and 1,43 mL) and were hypothyroid despite replacement therapy. The remaining 5 women after surgery were without levothyroxine and were in a euthyroid state, with 3 being operated on for nodular goiter. The mean thyroid volume in the whole group of 9 women who underwent prior thyroid surgery was $6,88 \pm 4,13$ mL; median 8,18, minimum 0,26/maximum 12,10 (25th percentile - 3,27, 50th percentile - 8,18, 75th percentile 10,12).

The remaining 538 pregnant women without thyroid surgery had a mean thyroid volume of $8,97 \pm 2,56$ mL; median 8,65, minimum 3,28/maximum 23,04 mL (25th percentile - 7,24, 50th percentile - 8,65, 75th percentile 10,37). The data for the three groups (total, operated and non - operated) are presented in Table 1 (Table 1).

Comparing the thyroid volume of the two groups with and without surgical treatment before the current pregnancy did not prove a significant difference

Table 1. Thyroid volume for the whole group, with and without thyroid surgery before pregnancy.

		Thyroid volume for the whole group, n=547 (100%)	Thyroid volume in previous thyroid surgery, n=9 (1,6%)	Thyroid volume without previous thyroid surgery, n=538 (98,4%)
Mean level		8,94	6,88	8,97
Standard Deviation		2,62	4,13	2,56
Median		8,65	8,18	8,65
Minimum		0,26	0,26	3,28
Maximum		23,04	12,10	23,04
Percentiles	25	7,23	3,27	7,24
	50	8,65	8,18	8,65
	75	10,37	10,12	10,37

Level of UIC	Indicator	TSH (mIU/L)	Thyroid volume (mL)
0-149 µg/L	number	221	221
	Mean value	2,6	9,08
	Standard Deviation	1,43	2,70
	Median	2,46	8,70
	Minimum	0,05	1,43
	Maximum	9,89	21,03
150-249 µg/L	number	211	211
	Mean value	2,92	8,88
	Standard Deviation	2,32	2,69
	Median	2,49	8,56
	Minimum	0,02	0,26
	Maximum	24,15	23,04
250-497 µg/L	number	115	115
	Mean value	2,77	8,77
	Standard Deviation	1,33	2,26
	Median	2,60	8,65
	Minimum	0,32	3,89
	Maximum	7,22	18,38

Table 2.

TSH level and thyroid volume at the three main UIC levels (NS).

(NS). As can be seen, the medians are very close and, moreover, the number of pregnant women (only 9) with thyroid surgery is insignificant. Identical data and in the absence of a significant difference for the whole group of 547 women and the group of 538 unoperated women allows us to consider the thyroid volume for the whole group of 547 in terms of its relationship with other factors.

Analysis of factors that affect thyroid volume.

1. Urine iodine concentration (UIC)

The role of UIC on TSH level and thyroid volume was studied at the three main UIC levels – low (≤ 149 µg/L), normal (150-249 µg/L) and over-optimal (250-497 µg/L), without finding a significant difference between the indicators at the three UIC levels (Table 2).

2. Sequence of trimester

During pregnancy, thyroid volume usually increases, which is presented in Table 3. The Kruskal-Wallis Test revealed a significant difference in thyroid volume between the first and third trimesters ($8,42 \pm 2,55$ mL vs $9,31 \pm 2,80$ mL, $p < 0,011$).

Table 3. Dynamics of thyroid volume in women at different stages of pregnancy.

Trimester	Number	Mean value	Standard Deviation	Median	Minimum	Maximum
First	110	8,42*	2,55	7,98	1,43	17,20
Second	276	8,92	2,47	8,74	0,26	23,04
Third	161	9,31*	2,80	9,00	4,08	21,03
Total	547	8,94	2,60	8,65	0,26	23,04

*p<0,011

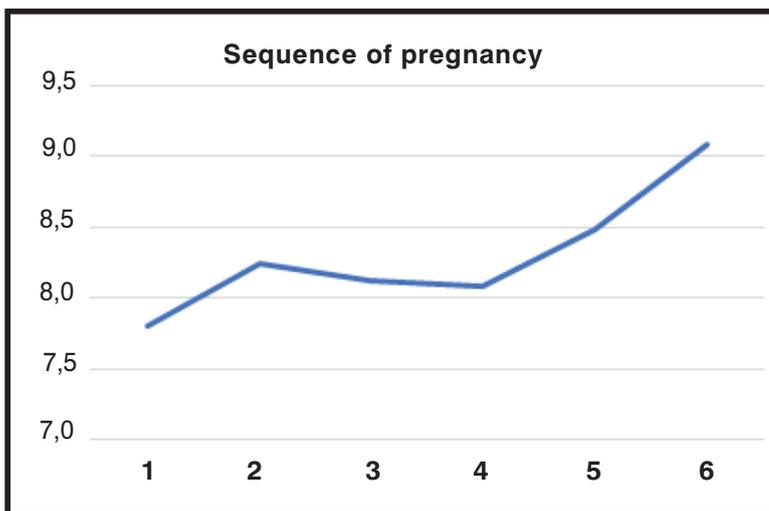


Figure 1.

Thyroid volume according to the sequence of pregnancy.

A correlation between thyroid volume and consecutive trimester was also demonstrated ($p<0,014$) (Table 4).

3. Sequence of pregnancy

It is examined to what extent the sequence of pregnancy is important for the volume of the thyroid gland. It was found that 245 (44,8%) of women had a first pregnancy, and the remaining 302 (55,2%) were distributed between a second pregnancy – 216 (39,5%), a third pregnancy – 57 (10,4%), a fourth – 19 (3,5%) and fifth respectively sixth sequence pregnancies – 10 (1,8%). He found a significant increase in thyroid volume when comparing the index in the first pregnancy against all other sequence of pregnancies – $8,67\pm 2,23$ mL, median 8,35 mL vs. $9,15\pm 2,85$ mL, median 8,96 mL ($p<0,01$) (Fig. 1).

4. Other factors – TPOAb (+), newly discovered hypothyroidism, newly discovered nodular goiter

Significantly higher thyroid volume was found in 55 pregnant women with TPOAb(+) – $10,17\pm 3,67$ mL, median – 10,12 (minimum 1,43/maximum 23,04) compared to 492 pregnant women with TPOAb(-) – $8,80\pm 2,42$ mL, median – 8,42 (minimum 0,26/maximum 21,03), $p<0,002$. In newly diagnosed hypothyroidism, the thyroid volume was significantly

lower than the known – $8,44\pm 2,34$ mL, median 7,97 (minimum 3,89/maximum 17,47) against $9,13\pm 2,68$ mL, median 8,92 (minimum 0,26/maximum 23,04), $p<0,001$.

The thyroid volume was found to be significantly higher in the newly diagnosed nodular goiter compared to the known ($9,77\pm 2,81$ mL, median 9,33 – minimum 4,96/maximum 20,26 vs $8,73\pm 2,51$ mL, median 8,34, minimum 0,26/maximum 23,04, $p<0,001$), as well as in pregnant women with more than one node compared to a single node ($11,39\pm 3,18$ mL, median 11,15, minimum 6,55/maximum 20,26 vs $8,77\pm 2,48$ mL, median 8,40, minimum 0,26/ maximum 23,04, $p<0,001$).

Thyroid nodules (≥ 5 mm) or a frequency of 21,75% were found in 119 pregnant women on ultrasonographic examination. In fact, only 8 pregnant women (6,7%) were diagnosed before the current pregnancy, and the remaining 111 (93,3%) pregnant women had a newly diagnosed nodular goiter. It is in these pregnant women that an ultrasonographic examination of the thyroid gland was performed for the first time during the screening. Families with thyroid disease were found in 29/119 (24,4%) of pregnant women with thyroid nodules.

Six percent of pregnant women (33/547) had more than one formation and sometimes they had

different structural characteristics. Based on the structural characteristics of the nodes, the cases were distributed as follows: cysts – 68 (12,4%), mixed – 41 (7,5%), solid – 21 (3,8%), hypoechoic – 6 (1,1%). As can be seen, the largest share is of cystic nodules (12,4%), followed by mixed (7,5%).

The distribution by functional status in nodular goiter showed that 23,5% had hypothyroidism – 28 pregnant women (20 with subclinical hypothyroidism and 8 with clinical hypothyroidism). Only 4 pregnant women (3,3%) had hyperthyroidism and 10 pregnant women (8,4%) had low T₄ syndrome, with the remaining 78 (65,6%) having normal thyroid function.

The analysis showed that there is a correlation between the presence of nodules in the thyroid gland and the level of TSH – Spearman's rho=0,139, p<0,01, as well as between the newly discovered nodular goiter and TSH – Spearman's rho=0,089, p<0,038. Only

An additional analysis was performed on two subgroups of pregnant women – Group 1 (320 „thyroid healthy“, 58,5%), which excluded women with thyroid dysfunction, with TPOAb(+), as well as those administering drugs with an effect on thyroid function (30) and Group 2 (227 „thyroid patients“, 41,5%). The relationship between thyroid volume and the factors influencing it in the two subgroups was re-examined and compared.

The role of iodine

The level of UIC in the two subgroups of pregnant women Group 1 and Group 2 is presented in Table 4 (Table 4).

It was found that there was no significant difference between the two subgroups in terms of the mean level resp. median UIC (Group 1 – 174,8±90,1

Table 4. Mean values and median UIC in the general group as well as in the two subgroups (Group 1 and Group 2).

Groups of pregnant women	Mean level	Standard Deviation	Number	Median	Minimum	Maximum
Group 1 n=320	174,84	90,1	317	165	11	482
Group 2 n=227	191,35	98,7	220	179	21	497
Total n=547	181,61	93,9	537	170	11	497

14 pregnant women (11,8%) with goiter were found to have TPOAb(+). These antibodies are found in ¾ of cases in pregnant women with diffuse thyroid structural changes and only in ¼ of cases are present in focal changes.

The analysis of the relationship between thyroid volume and TPOAb level showed that the volume of TPOAb(-) was significantly lower compared to TPOAb(+) pregnant women – 8,80±2,42 mL, median 8,42 (minimum 0,26/maximum 21,03) vs 10,17±3,67 mL, median 10,12 (minimum 1,43/maximum 23,04), p<0,002. There was also a significant correlation between thyroid volume and the presence of TPOAb(+) – p<0,02.

It is noteworthy that the incidence of TPOAb(+) was different in the three trimesters and while in the first and second trimesters it was about 10-12%, in the third trimester there was a significant decrease in TPOAb(+) compared to the second trimester – 6,8% (11/161) vs. 11,96% (33/276), p<0,05. In pregnant women with hypothyroidism TPOAb(+) was present in 28,2% (22/144), while in euthyroid pregnant women – in 9,1% (32/350), ie. 3 times less often, p=0,057.

µg/mL vs Group 2 – 191,3±98,7 µg/mL, NS), and in both cases UIC was within the accepted normal levels (150-249 µg/mL). There was also no significant difference in the level of UIC between the general group and each of the subgroups (NS). At the same time, the comparison made in the thyroid volume of the two subgroups of pregnant women found a significant difference (Group 1 - 9,16±2,44 mL vs Group 2 – 8,62±2,79 mL, T-6,223, p<0,001). Therefore, with slightly lower UIC, there was a significantly higher thyroid volume in pregnant women without thyroid pathology than in those with existing (Table 5).

The role of trimester sequence

The role of trimester sequence in the two subgroups was investigated and it was found that the thyroid volume was significantly higher only in the first trimester in Group 1 (n=62) compared to Group 2 (n=48) – 8,90±2,40 mL, median 8,62, minimum 3,68/ maximum 15,33 vs 7,8±2,64 mL, median 7,58, minimum 1,43/maximum 17,20 (p<0,0015). This means that the

Table 5. Mean and median of thyroid volume in the whole group of pregnant women, as well as in Group 1 and Group 2.

Groups	Mean level	Standard Deviation	Number	Median	Minimum	Maximum
Group 1 n=320	9,16	2,44	320	8,96	3,68	21,03
Group 2 n=227	8,62	2,79	227	8,06	0,26	23,04
Total n=547	8,94	2,60	547	8,65	0,26	23,04

thyroid gland increases significantly more in the first trimester in pregnant women without thyroid pathology than in those with existing pathology. It should be noted that during the second and third trimesters, respectively, no significant difference in thyroid volumes was found between the two subgroups.

The role of sequence of pregnancy

Significantly higher thyroid volume was found in the first pregnancy for women in Group 1 compared to Group 2 – $9,01 \pm 2,09$ mL, median 8,59, minimum 4,32/maximum 15,33 mL vs $8,2 \pm 2,35$ mL, median 7,89, minimum 0,26/maximum 14,11 mL, $p < 0,005$. At the same time, in sequence pregnancy (from second to sixth pregnancy) no significant difference was found between the two subgroups (Group 1 – $9,29 \pm 2,68$ mL, median 9,10, minimum 3,68/maximum 21,03 mL vs Group 2 – $8,95 \pm 3,07$ mL, median 8,23, minimum 1,43/maximum 23,04 mL, NS).

The mean thyroid volume for Group 1 of 320 pregnant women was $9,16 \pm 2,44$ mL. Among them, 69 women had nodular goiter, whose average volume was $9,99 \pm 3,18$ mL, but was slightly higher than in the whole group, NS. In the same Group 1, no significant difference in thyroid volume was found in the 49 women with more than one thyroid node compared to the 20 cases with one node – $11,21 \pm 3,81$ mL vs $9,48 \pm 2,72$ mL, NS.

Discussion

Thyroid volume during pregnancy is influenced by various factors – iodine replacement, genetic factors, age, TSH, anthropometric parameters, number of births and smoking (31). Zaletel G (2011) suggests that an increase in the thyroid gland during pregnancy and a reverse decrease after birth may be associated with an increased blood supply to the thyroid gland during pregnancy (32). The most common major thyroid growth stimulators during pregnancy are TSH, hCG, and iodine deficiency (33).

In the present work, we found that the mean thyroid volume level as well as the TSH level did not differ significantly at the three UIC levels. A similar finding was found in Shi X et al. (2015), who found that low UIC levels had no effect on serum TSH or FT_4 levels (34). We also did not establish a significant correlation between UIC and thyroid volume, as well as between UIC and TSH level. It should be noted that the median UIC of the 547 pregnant women surveyed was normal and this puts our country in the group of countries that have eliminated iodine deficiency.

Therefore, the found normal parameters in our material – TSH and thyroid volume are a direct result of the proven iodine adequacy in the country. It should be borne in mind that in another of our studies it was documented that over 50% of the studied pregnant women take additional multivitamins with minerals (including iodide 150 $\mu\text{g/L}$) (35). This is done according to the protocol of obstetricians and gynecologists in our country and is obviously an additional factor accounting for the good results in the studied population of pregnant women. Thus, while 280 (51,2%) pregnant women under vitamin and mineral supplementation had a thyroid volume of $7,89 \pm 2,12$ mL, in 79 (14,7%) pregnant women without supplementation, the volume was $8,50 \pm 2,37$ mL, NS. This does not include 188 other women who are taking a medicine other than vitamins and minerals.

Slovenian authors found an increase in thyroid volume during pregnancy and the difference was significant between the first and third trimester – ($8,7 \pm 2,5$ mL vs $11,3 \pm 3,1$ mL, $p < 0,001$) (28). The same finding was made by the Turkish author Özdi-kici M (2018) – $11,95 \pm 1,90$ mL against $17,20 \pm 1,2$ mL, $p < 0,01$ (36). Our data are similar, illustrating a significant difference in thyroid volume between the first and third trimesters, $p < 0,011$.

We also found that sequence of pregnancies also affected thyroid volume, proving a significant difference – thyroid volume in 245 women with a first pregnancy versus thyroid volume in the remaining

302 pregnant women with sequence pregnancies - $8,67 \pm 2,23$ mL vs $9,15 \pm 2,85$ mL ($p < 0,01$). Of note is the sharper increase in thyroid volume in the second pregnancy compared to the first, retention in the volume in the third and fourth pregnancies and then a new rise in volume (Fig. 1).

Park CE (2018) found that over 18% of pregnant women have positive TPOAb or TgAb (37). In general, many authors believe that TPOAb predicts the risk of developing hypothyroidism (38, 39). In our material, a link between TPOAb(+) and hypothyroidism was also demonstrated. It turns out that TPOAb(+) is significantly more often present in pregnant women with hypothyroidism than in euthyroid pregnant women, $p = 0,057$. Thyroid volume was also significantly higher in pregnant women with TPOAb(+) compared to pregnant women with TPOAb(-), $p = 0,002$. Thus, the three factors turn out to be very closely related.

Carlé A et al. (2009) found that thyroid volume in autoimmune thyroiditis has a Gaussian distribution in both sexes, but is not a bimodal model. Increased thyroid volume is observed in individuals with higher thyroid TPOAb, and lower volume in individuals with more pronounced hypothyroidism (40). Our finding is the same - significantly higher thyroid volume is present in our pregnant women with TPOAb(+) ($p < 0,002$) and significantly lower thyroid volume is found in pregnant women with hypothyroidism ($p < 0,001$).

We also proved a strong correlation between TPOAb and the ultrasound structural characteristic of the thyroid gland (hypoechoogenicity, inhomogeneity), $p < 0,001$. Ultrasound data were found for hypoechoogenicity in 13,7% (75/547) and for inhomogeneity in 21,6% (118/547) of pregnant women. These structural features were found to be directly related to the level of TPOAb. While in pregnant women with TPOAb(+) hypoechoogenicity is present in 36% (27/75) and inhomogeneity in 34,7% (41/118), in pregnant women with TPOAb(-) hypoechoogenicity is found in 5,9% (28/472) and inhomogeneity in 3,3% (14/429). The differences were very significant in both cases, $p < 0,0001$. Therefore, there is a multiple higher frequency of TPOAb(+) in pregnant women with hypoechoic respectively inhomogeneous ultrasound structural characteristic of the thyroid gland.

The cell-mediated and humoral immune responses are attenuated during pregnancy. The immune response is shifted to humoral immunity and thus develops immune tolerance to fetal tissues. For this reason, TPOAb and TgAb levels decrease during pregnancy, reaching their lowest levels in the third trimester (41, 42). It is also impressive in our material that the frequency of cases of TPOAb(+) was different in the three trimesters and while in the first and second trimesters it was about 10-12%, in the third

trimester there was a significant decrease in TPOAb(+) compared to second trimester - 6,8% (11/161) against 11,96% (33/276), $p < 0,05$.

The analysis of the two subgroups (Group 1 and Group 2) did not show a difference in the thyroid volume with that of the whole group of 547 pregnant women (NS). The significantly greater increase in thyroid volume in 320 pregnant women without thyroid pathology compared to 227 pregnant women with thyroid pathology, provided that there was no significant difference in the level of UIC, led us to agree with the hypothesis of Berghout A, Wiersinga W (15). In fact, the volume and function of the thyroid gland during pregnancy is physiologically adapted to meet the increased needs for iodine and energy.

Conclusion: Globally, iodine status has improved over the last 25 years and this has led to an improvement in the health and economic situation of the population, mainly in low- and middle-income countries (43). This is the main factor that affects thyroid volume. In pregnant Bulgarian women in more than 97% of cases the thyroid volume is normal and directly reflects the normal mean level of UIC/mUIC in them. The additional intake of combined vitamins with minerals (including iodide 150 µg/L) is an important factor for good results in the studied population of pregnant women. The slight increase in thyroid volume during pregnancy is most likely an expression of physiological adaptation in response to mild iodine deficiency in this period of increased needs.

In general, the health care system must focus its efforts on maintaining this achievement of universal iodine replacement in order to prevent iodine deficiency disorders. Pregnant women together with children are the most sensitive part of the population, for which care in this aspect is our primary concern.

Acknowledgements

The authors thank 104 endocrinologists and obstetricians who supported the project: V. Yotova (Troyan), S. Dimitrova (Gabrovo), Anchev (Gabrovo), Mitev (Gabrovo), A. Popov (Gotse Delchev), A. Andreev (Samokov), E. Apostolova (Smolyan), M. Hubchev (Smolyan), S. Dimitrov (Pirdop), R. Naumovska (Pleven), M. Manuelian (Burgas), K. Kirovakov (Burgas), T. Gabrovska (Burgas), M. Angelova (Stara Zagora), K. Venkova (Sofia), R. Velev (Sofia), I. Sigridov (Sofia), B. Bogoslovova (Sofia)... a total of 104 specialists from the country.

Technical support: T. Kornilova (Sofia), Z. Metodieva (Sofia), Y. Georgieva (Sofia), H. Atanasova (Burgas), L. Ilieva (Stara Zagora).

1. Petrova M, Koeva L, Chankova P. Iodine status and thyroid volume in pregnant women from the Black sea region. *Endocrinologia* 2000; 5(2): 39-45 (In Bulgarian) [Петрова М, Коева Л, Чанкова П. Йоден статус и тиреоиден обем при бременни жени от Черноморски регион. *Ендокринология* 2000; 5(2): 39-45].
2. Ivanova RB, Kirilov G, Ivanova LB, Lozanov B. Evaluation of thyroid status in pregnant women under supplementation with iodized table salt. *Endocrinologia* 2003; 8(1): 34-39 (In Bulgarian) [Иванова РБ, Кирилов Г, Иванова ЛБ, Лозанов Б. Оценка на тиреоидния статус при бременни жени при условия на профилактика с йодурана готварска сол. *Ендокринология* 2003; 8(1): 34-39].
3. Lozanov B, Ivanova LB, Timcheva Tz, Vukov. Eradication of iodine deficiency disorders in Bulgaria – results of the national representative survey on the iodine status and the endemic goiter – 2003. *Endocrinologia* 2004; 9(3): 46-56 (In Bulgarian) [Лозанов Б, Иванова Л, Тимчева Ц, Вуков М. Ликвидиране на йоддефицитните заболявания в България - резултати от национално представително проучване на йодния статус и ендемичната гуша - 2003. *Ендокринология* 2004; 9(3): 46-56].
4. Angelova K, Timcheva Tz, Tenev T, Atzeva E, Bojilova D. National Study of Urinary Iodine Excretion – Biomarker of Iodine Nutrition. *Bulgarian Journal of Public Health* 2009; 1(3): 66-72 [Ангелова К, Тимчева Ц, Тенев Т, Ацева Е, Божилков Д. Национално проучване на йодурия - биомаркер за йоден прием. *Българско списание за общественото здраве* 2009; 1(3): 66-72].
5. Ivanova LB, Ivanova RB, Kovacheva R, Lozanov BS. Urinary Iodine Excretion in Pregnant Women after the Introduction of Universal Salt Iodization in Bulgaria. *Endocrinologia* 2013; 1 (18): 5-11 (In Bulgarian) [Иванова ЛБ, Иванова РБ, Ковачева Р, Лозанов БС. Йодурия при бременни жени след въвеждане на универсално йодуране на готварската сол в България. *Ендокринология* 2013; 1 (18): 5-11].
6. Stortoni P, Tranquilli AL. Hypothyroidism, Fertility and Pregnancy, In: Current Topics in Hypothyroidism with Focus on Development. 2012. <http://dx.doi.org/10.5772/54328>.
7. Marine D, Kimball OP. The prevention of simple goiter in man: fourth paper. *Arch Intern Med* 1920; 25: 661–672.
8. Iodine Deficiency Disorders and Their Elimination, Ed. Elizabeth N. Pearce, Springer, 2017.
9. Clements FW, De Moerloose J, De Smet MP, Holman JCM, Kelly FC, Langer P, et al. Preface. In: Endemic goiter, World Health Organization monograph series, no. 44. Geneva: World Health Organization; 1960, p. 7–8.
10. Hintze G, Windeler J, Baumert J, Stein H, Kobberling J. Thyroid volume and goiter prevalence in the elderly as determined by ultrasound and their relationships to laboratory indices. *Acta Endocrinol* 1991; 124: 12–18.
11. Rasmussen NG, Hornnes PJ, Hegedus L. Ultrasonically determined thyroid size in pregnancy and postpartum: the goitrogenic effect of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160: 1216–1220.
12. Berghout A, Wiersinga WM, Smits NJ & Touber JL. Determinants of thyroid volume as measured by ultrasonography in healthy adults in a non-iodine deficient area. *Clin Endocrinol* 1987; 26: 273–280.
13. Romano R, Jannini EA, Pepe M, Grimaldi A, Olivieri M, Spennati P, et al. The effects of iodoprophylaxis on thyroid size during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 482–485.
14. Berghout A, Endert E, Ross A, Hogerzeil H, Smits NJ, Wiersinga WM. Thyroid function and thyroid size in normal pregnant women living in an iodine replete area. *Clin Endocrinol* 1994; 41: 375–379.
15. Arie Berghout and Wilmar Wiersinga. Thyroid size and thyroid function during pregnancy: an analysis. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 536–542.
16. Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD. Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med* 1994; 154: 1838–1840.
17. Knudsen N, Perrild H, Christiansen E, Rasmussen S, Dige-Petersen H, Jorgensen T. Thyroid structure and size and two year follow-up of solitary cold thyroid nodules in an unselected population with borderline iodine deficiency. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 224–230.
18. Struve CW, Haupt S, Ohlen S. Influence of frequency of previous pregnancies on the prevalence of thyroid nodules in women without clinical evidence of thyroid disease. *Thyroid* 1993; 3: 7–9.
19. Bidey SP, Hill DJ, Eggo MC. Growth factors and goitrogenesis. *J Endocrinol* 1999; 160: 321–332.
20. Shinkov A, Borissova A-M, Kovatcheva R, Dakovska L, Vlahov J, Vukov M. Comparison of thyroid nodule prevalence in two population-based studies in Bulgaria: 2006 and 2012. *18th European Congress of Endocrinology 2016, 28–31 May 2016, Munich, Germany, 2016 Volume 41, EP1039, ISSN 1479-6848 (online)*.
21. WHO, UNICEF, ICCIDD. Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. A guide for programme managers, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 2001.
22. World Medical Association. Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA* 2013; 310 (20): 2191–2194. doi:10.1001/jama.2013.28105.
23. Brunn J, Block U, Ruf G, Bos I, Kunze WP, Scriba PC. Volumetric analysis of thyroid lobes by real-time ultrasound. *Dtsch Med Wochenschr* 1981; 106: 1338–1340.
24. Zimmermann MB, Hess SY, Molinari L, de Benoist B, Delange F, Braverman LE, et al. New reference values for thyroid volume by ultrasound in iodine-sufficient-schoolchildren: a World Health Organization / Nutrition for Health and Development Iodine Deficiency Study Group Report. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 231–237.
25. Boyanov M, Vidinov K. Ultrasound of the cervical region in the practice of the endocrinologist. 2011, Pages 25-32. *Central Medical Library, Medical University – Sofia, Bulgaria*.
26. Halenka M, Z. Frysak. Atlas of Thyroid Ultrasonography. 2.2. US Features of Diffuse goiter. 2017 Springer Int. Publishing AG, Cham, Switzerland.
27. World Health Organization. Indicators for assessing iodine deficiency disorders and their control through salt iodization. Geneva, Switzerland. WHO, 1994. Document No WHO/NUT 94.6.
28. Fister P, Gaberscek S, Zaletel K, Krhin B, Gersak K, Hojker S. Thyroid volume changes during pregnancy and after delivery in an iodine-sufficient Republic of Slovenia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 145(1): 45-48.
29. Miccoli P, Minuto MN, Orlandini C, Galleri D, Massi M, Berti P. Ultrasonography estimated thyroid volume: a prospective study about its reliability. *Thyroid* 2006; 16: 37-39.

30. **Medici M, Korevaar TI, Visser WE, Visser TJ, Peeters RP.** Thyroid function in pregnancy: what is normal? *Clin Chem* 2015; 61(5): 704–713.
31. **Hansen PS, Brix TH, Bennesaek FN, Bonne-ma SJ, Kyvik KO, Hegedüs L.** Genetic and environmental causes of individual differences in thyroid size: A study of healthy Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(5): 2071–2077.
32. **Zaletel G.** Thyroid physiology and autoimmunity in pregnancy and after delivery. *Expert Rev Clin Immunol* 2011; 7(5): 697–707.
33. **Berghout A, Endert E, Ross A, Hogerzeil H, Smits NJ, Wiersinga WM.** Thyroid function and thyroid size in normal pregnant women living in an iodine replete area. *Clin Endocrinol* 1994; 41: 375–379.
34. **Shi X, Han C, Li C, Mao J, Wang W, Xie X, et al.** Optimal and safe upper limits of iodine intake for early pregnancy in iodine-sufficient regions: a cross-sectional study of 7190 pregnant women in China. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 1630–1638.
35. **Borissova A-M, Ivanova L, Trifonova B, Dakovska L, Mihailova E, Vukov M.** Iodine Status of Pregnant Women in Bulgaria. *European Journal of Preventive Medicine* 2020; 8(4): 43–47.
36. **Özdikici M.** Ultrasonographic Evaluation of Changes in Thyroid Volume In Women During Pregnancy and Lactation. *Biomed J Sci Tech Res* 2018; 6(5): 3382–5584.
37. **Park CE.** Evaluation of Pregnancy and Thyroid Function. *Korean J Clin Lab Sci* 2018; 50: 1–8.
38. **Muller I, Taylor PN, Lazarus JH.** Thyroid function in pregnancy. *Ann Thyroid* 2018; 3: 27.
39. **Medici M, de Rijke YB, Peeters RP, Visser W, de Muinck Keizer-Schrama SMPF, Jaddoe VVW, et al.** Maternal early pregnancy and newborn thyroid hormone parameters: the Generation R study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 646–652.
40. **Carlé A, Pedersen IB, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Jørgensen T, Laurberg P.** Thyroid Volume in Hypothyroidism due to Autoimmune Disease Follows a Unimodal Distribution: Evidence against Primary Thyroid Atrophy and Autoimmune Thyroiditis Being Distinct Diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94 (3): 833–839.
41. **Smyth PP, Wijeyaratne CN, Kaluarachi WN, Smith DF, Premawardhana LD, Parkes AB, et al.** Sequential studies on thyroid antibodies during pregnancy. *Thyroid* 2005; 15: 474–477.
42. **Weetman AP.** Immunity, thyroid function and pregnancy: molecular mechanisms. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6: 311–318.
43. **Gorstein JL, Bagriansky J, Pearce EN, Kupka R, Zimmermann MB.** Estimating the Health and Economic Benefits of Universal Salt Iodization Programs to Correct Iodine Deficiency Disorders. *Thyroid* 2020 Jul 17. doi: 10.1089/thy.2019.0719.

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

Ефект на хипотиреоидизма върху атерогенните липопротеини, инсулиновата резистентност и адипонектина при пациенти с нормално и наднормено тегло

Лозанов, Лъчезар Б.¹, Колева, Веселина С.², Лозанов, Боян С.¹, Арзирова, Радка М.², Горчева, Десислава И.¹, Костова, Бойка К.¹, Борисов, Радослав П.¹, Вуков, Мирчо И.¹

¹ Ендокринно отделение, Аджибagem Сити Клиник Токуда болница

² Клинична лаборатория, Аджибagem Сити Клиник Токуда болница

Адрес за кореспонденция:

Доц. д-р Лъчезар Лозанов, д.м.
Аджибagem Сити Клиник Токуда болница
Бул. „Н. Вапацаров“ 51Б, София 1407
e-mail: l.lozanov@abv.bg

Постъпване: 23. 10. 2020

Приемане: 01. 11. 2020

Резюме

Хипотиреоидизмът и затлъстяването са често срещани заболявания, които влияят върху липидния метаболизъм. Предизвикателствата в тяхната ко-морбидност са свързани с различните патогенетични механизми, свързани с липидните нарушения, инсулиновата резистентност и участие на адипоцитокините.

Цел: да се изследват атерогенните фракции на липопротеините, индексите на инсулинова резистентност и серумните нива на адипонектин при пациенти с хипотиреоидизъм и връзката им с телесното тегло.

Материали и методи: В проучването са включени 118 пациенти (85 жени и 33 мъже, средна възраст 43 ± 11 г.), разделени в 4 групи според индекс на телесна маса (ИТМ): Група А – 31 хипотиреоидни пациенти със затлъстяване, Група В – 30 еутиреоидни пациенти със затлъстяване, Група С – 28 хипотиреоидни пациенти с нормален ИТМ и Група К – 29 еутиреоидни лица с нормално тегло (контроли). Лабораторният панел включва: TSH и FT₄ (СМIA), Lipoprotein(a) [Lp(a)] (имунно-турбодиметричен ензимен метод – ITDM), Аполипопротеин В (АpoВ) (ITDM), общ холестерол (Т-Chol), липопротеини с ниска плътност (LDL), адипонектин (ELISA), стандартен ОГТТ (глюкоза и инсулин), HOMA-IR. Статистическите анализи са извършени с SPSS/Windows 13.0.

Резултати. Хипотиреоидните пациенти с нормален ИТМ (Група С) имат най-висока средна стойност и медиана на Т-Chol, LDL, Lp(a), АpoВ и адипонектин в сравнение с тези в останалите три групи ($p < 0,0001$). Медианата на Lp(a) на обединените хипотиреоидни групи (А+С) е неколкостранно по-висока спрямо тази на обединените еутиреоидни групи (В+К) със стойности съответно 117 и 22 mg/L ($p < 0,0001$). Налице е положителна корелация между TSH и Lp(a). HOMA-IR и стимулираният инсулин при орален глюкозо толерантен тест (ОГТТ) са значимо по-високи при хипотиреоидните отколкото при еутиреоидните пациенти ($p < 0,001$). Адипонектинът е сигнификантно по-висок при хипотиреоидната отколкото в обединената еутиреоидна група ($p < 0,001$). Налице е положителна корелация между TSH и адипонектина и в двете групи хипотиреоидни пациенти ($p < 0,001$).

Заключение. Данните показват значително повишени нива на Lp(a) и адипонектин при пациенти с хипотиреоидизъм, кореспондиращи с нивата на LDL, АpoВ, BMI и HOMA-IR. Може да се предположи, че повишеният адипонектин е компенсаторна протективна реакция спрямо повишения сърдечно-съдов риск или може да се дължи на резистентност към адипонектина.

Ключови думи: хипотиреоидизъм, аполипопротеини, адипонектин, инсулинова резистентност

Въведение

Хипотиреозизмът и затлъстяването са често срещани заболявания, за които е известно, че влияят върху липидния метаболизъм. Честотата на двете заболявания нараства прогресивно в световен мащаб, засягайки над 50% от населението по отношение на затлъстяването. Според многоцентрови проучвания при 19 996 пациенти със затлъстяване разпространението на явен и субклиничен хипотиреозизъм е съответно 14% и 14,6% (1). Предишващите относно тяхната ко-морбидност са свързани с различни патогенетични механизми, обуславящи нарушения в липидната обмяна, инсулинова резистентност и хронично възпаление. Имунологичният толеранс може да бъде повлиян директно и индиректно от секрецията на различни адипоцитокени (главно лептин, адипонектин, висфатин), също интерлевкин-6 (IL-6), тумор-некротизиращ фактор алфа (TNF α), интерлевкин-10 (IL-10). Крайният резултат е преход от Th-2 към Th-1 имунен отговор, стимулиращ проявата на автоимунни реакции (2,3).

Хипотиреозизмът има негативен ефект върху метаболизма на липопротеините, както и върху други рискови фактори за развитие на атеросклероза и сърдечно-съдови усложнения. Това се реализира по няколко механизма: 1. Потискане активността на 3-хидрокси-3 метилглутарил-коензим А-редуктазата, което е първата стъпка в биосинтезата на холестерола; 2. Потискане на генната експресия на LDL-рецепторите; 3. Повлияване на плазмените нива на липопротеин липазна активност, които увеличават остатъците на липопротеините (4).

Хипотиреозизмът води до увеличаване на атерогенните аполипопротеинови фракции като Аполипопротеин В (АpoВ) и Lipoprotein (a) [Lp(a)]. АpoВ съществува в две форми- АpoВ100 и АpoВ48, включително LDL, VLDL, IDL и хиломикрони. Lp(a) е отделен подклас, съдържащ LDL-подобни частици и специфичен аполипопротеин, който е ковалентно свързан с АpoВ. Той реализира връзката между липидите и кръвосъсирването, съответно между атерогенезата и съдовата тромбоза. Установена е структурна аналогия между Lp(a) и плазминогена, тъй като генът на Lp(a) се генерира от дублиране на плазминогенния ген (5). Високите нива на Lp(a) предсказват ранна атеросклероза, независимо от други рискови фактори, включително LDL. При пациенти с напреднали сърдечно-съдови заболявания високите Lp(a) показва повишен коагулантния риск и тромбоза на плаките, като стимулира пролиферацията на гладкомускулните клетки (6). Понастоящем Европейската асоциация за атеросклероза

препоръчва при пациентите с умерен или висок риск от сърдечно-съдови заболявания да се проверят нивата на Lp(a) (7).

Доказано е, че отделните изоформи на тиреоидните рецептори (TR) присъстват както в бялата (WAT), така и в кафявата (BAT) мастна тъкан, с преобладаване на T3R- β 1. T₃ регулира експресията на много гени, кодиращи липогенезата (особено LDL атерогенните липопротеини с ниска плътност), както и липолизата. Дисфункцията на щитовидната жлеза е свързана също с инсулинова резистентност (IR) (8). TSH стимулира инсулиновите нива на гладно и след хранене, като подтиска инсулиновата чувствителност. Установено е, че ниско-нормалните нива на FT са свързани с повишена инсулинова резистентност (9,10).

Някои проучвания показват, че при пациенти със захарен диабет тип 2 серумните нива на адипонектин корелират с инсулиновата резистентност (8). Ниските нива на адипонектин и високите нива на свободни мастни киселини (FFA) са свързани с IR, но може да се наблюдава адитивен ефект (11). Тези констатации се подкрепят от *in vitro* и *in vivo* проучвания, показващи, че адипонектинът инхибира синтеза на мастни киселини и стимулира тяхното окисление. Доказва се ключовата роля за адипонектин като инсулинов сенситизатор в мускулите, черния дроб и мастната тъкан (12,13).

Цел на изследването е да се проучат атерогенните фракции на липопротеините, серумните нива на адипонектина и индексите на инсулинова резистентност при пациенти с хипотиреозизъм, свързани с телесното тегло и висцералното затлъстяване.

Материали и методи

В проучването са включени 118 пациенти (85 жени и 33 мъже, средна възраст 43 \pm 11 г.), разделени в 4 възрастово съвпадащи групи, съставени според ИТМ: Група А – 31 затлъстели хипотиреоидни пациенти (24 жени, 7 мъже, среден ИТМ-36,1 kg/m²); Група В – 30 затлъстели еутиреоидни пациенти (16 жени, 14 мъже, среден ИТМ-38,6 kg/m²); Група С – 28 хипотиреоидни пациенти с нормално тегло (16 жени, 12 мъже, ИТМ- 24,8 kg/m²) и Група К – 29 здрави доброволци с еутиреоидна функция на щитовидната жлеза като контроли (19 жени, 10 мъже, ИТМ-22,4 kg/m²). Средната стойност на обиколката на талията и при двете групи с наднормено тегло е 102 cm (мъже) и 88 cm (жени).

Лабораторният панел включва: TSH (СМIA, референтен обхват 0,35-4,9 mU/L), FT₄ (СМIA, референтен обхват 9-19 pmol/L), Lipoprotein(a) [Lp(a)] (имунно-турбодиметричен ензимен метод

– ITDM, референтен обхват 0-300 mg/L), Аполипротеин В (АpoB) (ITDM, референтен обхват 0,53-1,82 g/L), общ холестерол (T-Chol, референтен обхват 3,5-6,2 mmol/L), липопротеини с ниска плътност (LDL, референтен обхват 1,8-4,1 mmol/L), липопротеини с висока плътност (HDL, референтен обхват 1,0-2,1 mmol/L), адипонектин (ELISA, референтен обхват 5-8,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), инсулин на гладно (чрез СМА, референтен обхват 3-17,1 mU/mL), оценка на хомеостатичен модел на инсулинова резистентност (НОМА-IR), стандартен OGTT (серумна глюкоза и инсулин на 0, 60 и 120 минути). НОМА-IR се изчислява по формула (глюкоза на гладно, умножена по инсулин, разделена на фактор 22,5). Стандартният орален глюкозо толерантен тест (OGTT), извършен при всички пациенти без диабет, включва глюкоза и серумен инсулин (базален инсулин, референтен обхват 3–17,1 mIU/L). НОМА-IR $\geq 2,5$ и серумен инсулин $\geq 30\text{mU}/\text{mL}$ на 120 минута от OGTT бяха приети като показателни за инсулиновата резистентност.

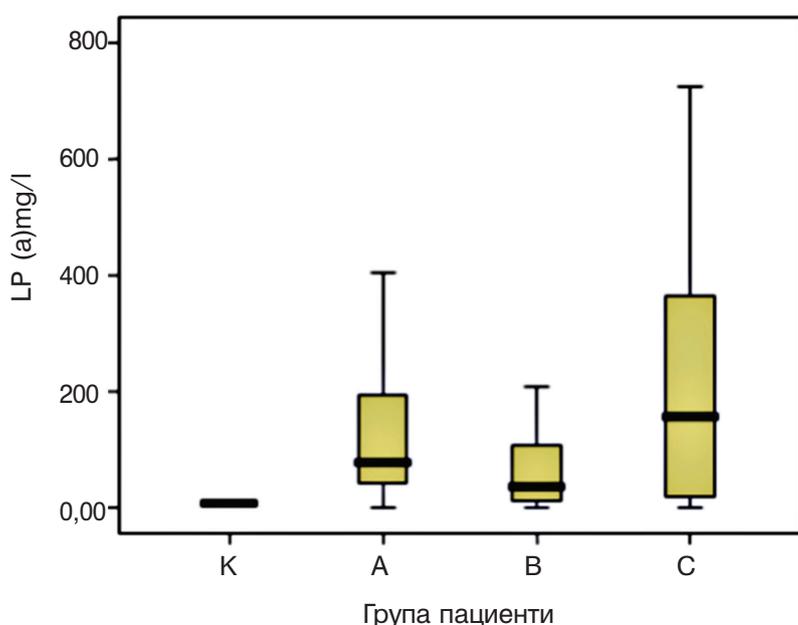
Статистическата обработка на данните включва: вариационен и честотен анализ, независими проби Т-тест, еднопосочен дисперсионен анализ (One-way ANOVA), непараметрични методи (хи-квадрат тест, точен тест на Фишер, тест на Крускал-Уолис, тест на Ман-Уитни), параметричен коефициент на линейна корелация Pearson, непараметричен коефициент на линейна корелация Spearman. Критичното ниво на значимост е $\alpha=0,05$. За обработка на данни е използвана версията SPSS – SPSS за Windows 13.0. Статистически анализи бяха извършени от SPSS за Windows 13.0.

Резултати

Средните стойности на TSH и стандартните отклонения в изследваните групи пациенти са: Група К – $1,68\pm 0,92$ mU/L, Група А – $12,23\pm 11,08$ mU/L, Група В – $1,87\pm 0,92$ mU/L, Група С – $27,93\pm 30$ mU/L (медиани: съответно 1,40-8,88-1,65-12,57 mU/L).

Основните количествени параметри за всяка от сравнените групи са представени в Таблица 1. Пациенти с хипотиреоидна функция на щитовидната жлеза с нормално телесно тегло (Група С) показват значително най-високи средни стойности на общия холестерол, LDL, HDL, Lp(a) и адипонектин в сравнение с тези от други групи ($p<0,0001$). Медианите на Lp(a) в четирите групи са подобни (Фиг. 1). Медианата на Lp(a) на обединените групи пациенти с хипотиреоидизъм (групи А+С) е значително по-висока в сравнение с тази на обединените групи еутиреоидни пациенти (групи В+К), чиито стойности са съответно 117 и 22 mg/L с $p<0,0001$ (Фиг. 2). Установява се непараметрична положителна корелация между TSH и холестерола, АpoB и Lp(a) (Фиг. 3). НОМА-IR и стимулираната глюкоза от OGTT са значително по-високи при хипотиреоидни отколкото при еутиреоидни пациенти, независимо от ИТМ ($p<0,001$).

Средните стойности и медианите на адипонектин са много по-високи при обединената група пациенти с хипотиреоидна функция на щитовидната жлеза, отколкото при обединената група с еутиреоидна функция ($p<0,001$) (Фиг. 4). Това е значителна положителна корелация между TSH и адипонектин и в двете групи пациенти с хипотиреоидна жлеза ($\rho=0,344$, $p<0,001$) (Фиг. 5).



Фигура 1.

Медиани на липопротеин (a) при изследваните групи пациенти. Група К – еутиреоидни контроли, Група А – хипотиреоидни пациенти със затлъстяване, Група В – еутиреоидни пациенти със затлъстяване, Група С – хипотиреоидни пациенти с нормално телесно тегло

Таблица 1. Средни стойности и медиани на количествените показатели на изследваните групи пациенти.

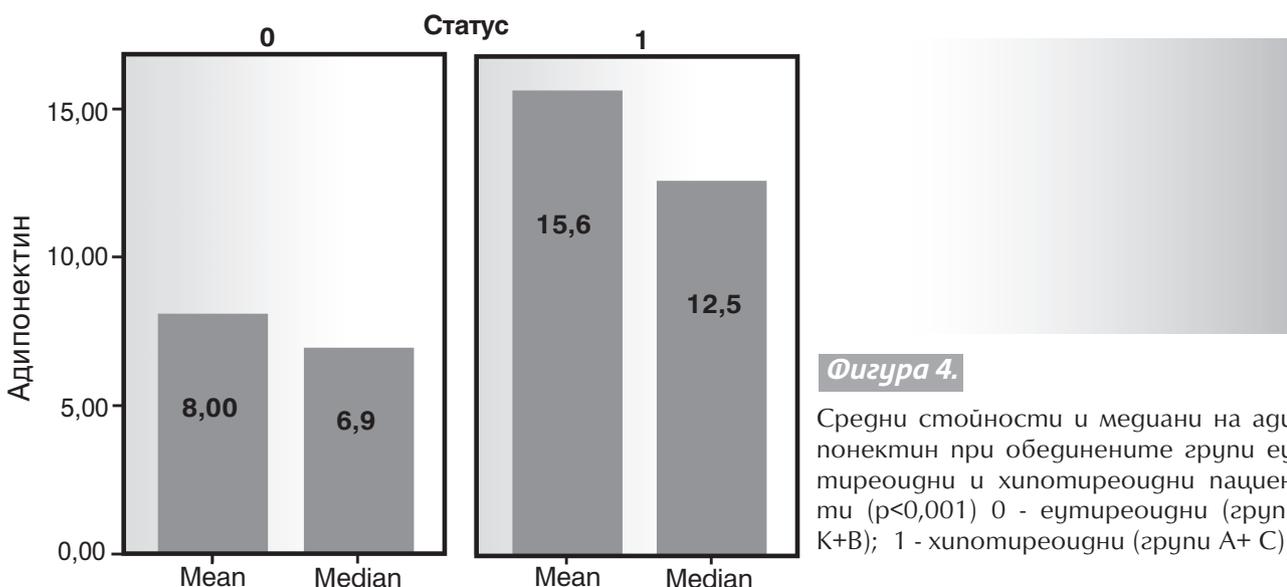
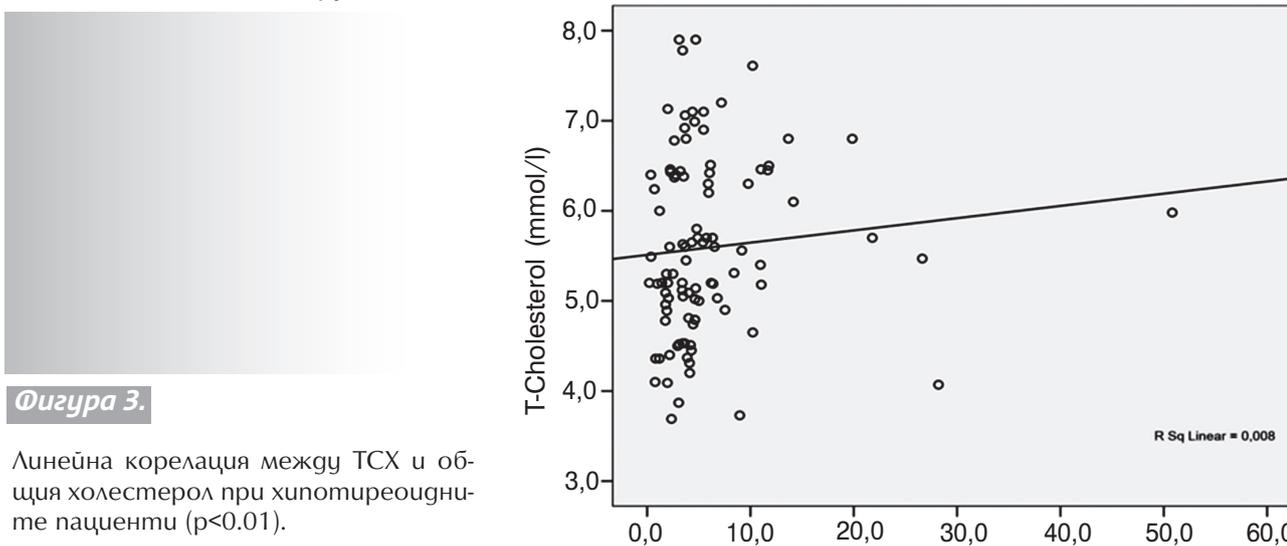
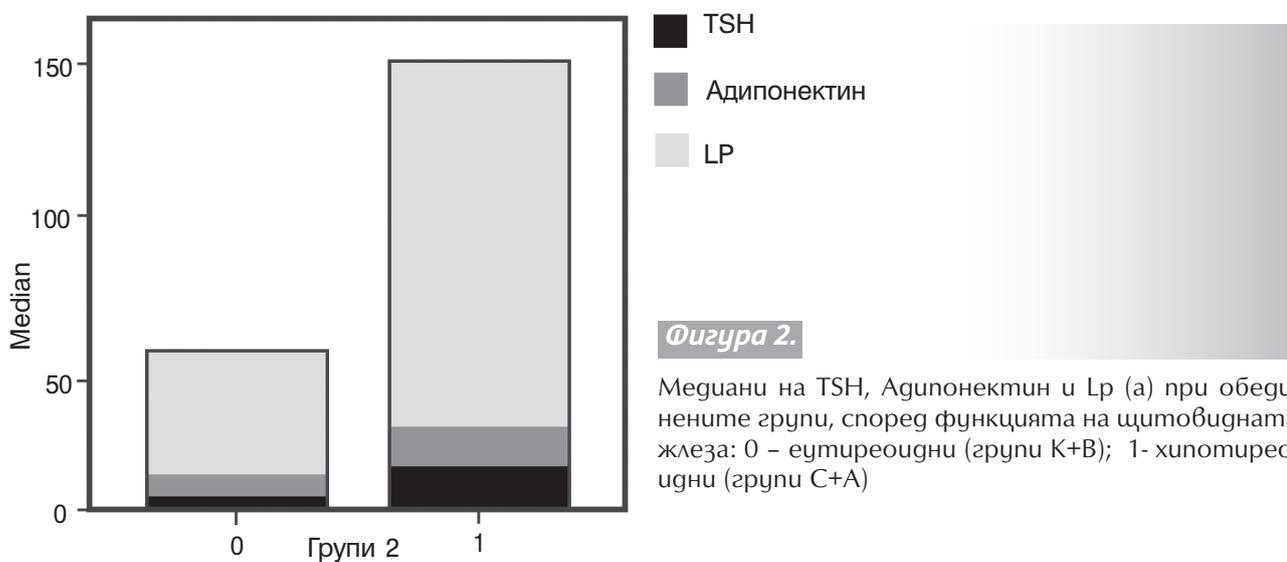
Variables		Patient groups				Difference	Test	P
		K	A	B	C			
Count		29	31	30	28			
Cholesterol (mmol/l)	Mean	4,9	5,4	5,9	6,4	*	KW	0,001
	± SD	0,78	1,06	0,93	2,32			
	Median	4,82	5,53	5,8	5,79			
3-glycerides (mmol/l)	Mean	1,48	1,70	1,58	1,25			
	± SD	0,285	1,061	0,831	0,659			
	Median	1,48	1,32	1,37	1,1			
LDL (mmol/l)	Mean	1,14	3,17	3,51	3,70	*	KW	<0,0001
	± SD	0,806	0,673	0,666	1,627			
	Median	0,84	3,1	3,45	3,15			
HDL (mmol/l)	Mean	2,51	1,30	1,23	1,64	*	ANOVA	<0,0001
	± SD	0,561	0,306	0,234	0,431			
	Median	2,33	1,2	1,185	1,615			
ApoB (g/l)	Mean	0,97	1,00	1,15	1,06	*	KW	0,005
	± SD	0,136	0,218	0,210	0,479			
	Median	1,02	1,0	1,1	0,93			
LP(a) (mg/l)	Mean	7,4	131,2	92,4	207,3	*	KW	0,012
	± SD	5,73	118,63	138,42	199,78			
	Median	7,35	77,9	36,5	156,6			
HOMA-IR	Mean	1,48	4,82	5,10	1,55	*	KW	<0,0001
	± SD	0,71	3,56	2,85	1,01			
	Median	1,3	3,14	4,36	1,39			
Adiponectin (mg/l)	Mean	6,0	11,6	7,5	19,1	*	KW	<0,0001
	± SD	4,14	7,01	4,39	10,96			
	Median	5,0	10,5	6,87	15,25			

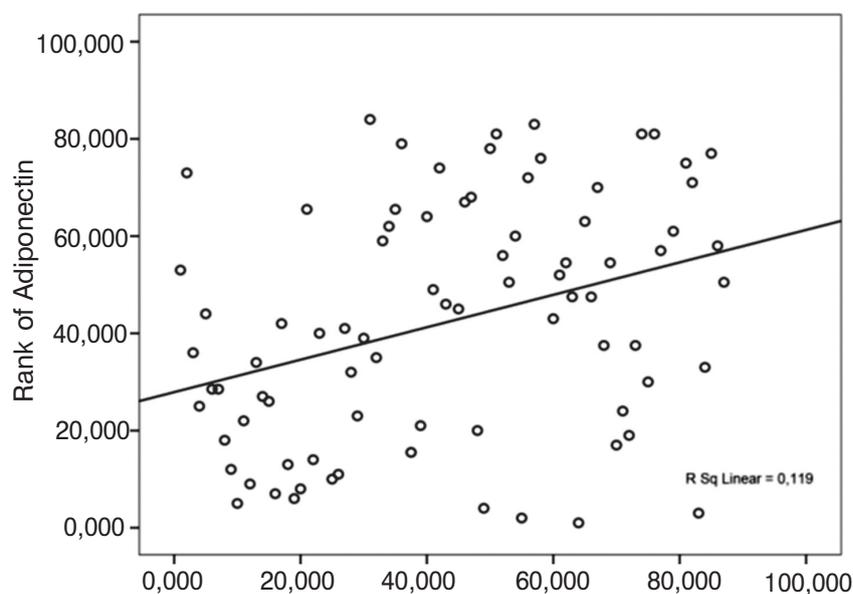
Сигнификантни разлики между поне една двойка групи, за които съответните тестове са маркирани с (*)

Обсъждане

Данните от настоящото проучване показват, че хипотиреозизмът води до тежки нарушения на липидния метаболизъм, отнасящо се за атерогенните фракции на холестерола – липопротеините с ниска плътност. В най-голяма степен това се отнася за Lp(a), чиито средни стойности при хипотиреозните лица с нормално телесно тегло (Група С) надхвърлят неколккратно тези при еутиреозните лица, включително при случаите със затлъстяване и сходен ИТМ (Група В). Редица проучвания през последните години доказват, че Lp(a) е високорисков прогностичен фактор за атеросклеротично сър-

гечно-съдово заболяване (АСССЗ) и инсулт, независимо от други липидни параметри, включително LDL (14,15). На това основание Европейското дружество по атеросклероза препоръчва при пациенти с умерен или висок риск от ССЗ да се изследва Lp(a), като целевите стойности трябва да са ≤ 14 mg/dL. Проектът BiomarCaRE, осъществен върху европейска популация, потвърждава, че Lp(a) е маркер за повишен риск от ССЗ при ниво >50 mg/dL, което съответства на препоръките на американските асоциации ACC/AHA (16-18). Данните от настоящото проучване показват много по-високи нива от така препоръчителните, което се отнася за всички групи изследвани пациенти, в най-голяма степен за тези с хипотиреозизъм, независимо от телесното





Фигура 5.

Линейна корелация между адипонектин и ТСХ при хипотиреоидните пациенти (А+С).

тегло. Установяват се също негативни ефекти на хипотиреоидизма върху инсулиновата чувствителност, което съответства на данните и на други автори (8-10).

Ефектите на тиреоидните хормони върху експресията на адипонектиновия ген при тиреоидна дисфункция остават неясни (19). Данните за ролята на тиреоидните хормони по отношение на адипонектина са противоречиви. Някои проучвания установяват намален адипонектин при хипотиреоидизъм, други не намират значителни разлики спрямо еутиреоидни лица. Изследвания върху експериментални животни показват повишени нива на адипонектин в серума на хипотиреоидни кучета и морски свинчета и намаляването им след заместване с левотироксин (20). Същият ефект на заместителната терапия върху адипонектиновите нива е описан и при хора с манифестен хипотиреоидизъм. В настоящето проучване установяваме повишени нива на адипонектин и в двете хипотиреоидни групи (С и А). Като се има предвид, че адипонектинът е доказан протективен фактор за ССЗ може да се предполага, че повишените нива на адипонектин при хипотиреоидизъм са компенсаторна реакция за намаляване на кардиоваскуларния риск

или се дължат на резистентност на адипонектиновите рецептори. Необходими са допълнителни клинични проучвания относно ролята на адипонектина и връзката му с атерогенните липопротеини при хипотиреоидизъм, както и върху ефекта на заместителната терапия с левотироксин върху тези показатели (21).

Заклучение

Данните от проучването показват, че хипотиреоидизмът е важен патогенетичен фактор за изявата на метаболитни нарушения, които водят до значимо нарастване на атерогенните аполипопротеини, особено на Lp(a), увеличавайки значително сърдечно-съдовия риск. Повишените стойности на адипонектин може да се рзглеждат като компенсаторна реакция или да се дължат на резистентност на адипонектиновите рецептори. Това е свързано с намаляване на инсулиновата чувствителност, тенденция за увеличаване на телесното тегло и на другите атерогенни фактори.

Декларация за интереси. Всички автори декларираат, че няма конфликт на интереси, който би могъл да бъде възприет като накърняващ безпристрастността на това изследване.

Effect of Hypothyroidism on Atherogenic Lipoproteins, Insulin Resistance and Adiponectin in Normal and Overweight Patients

Lozanov, Lachezar B.¹, Koleva, Veselina S.², Lozanov, Bojan S.¹, Argirova, Radka M.², Gorcheva, Desislava I.¹, Kostova, Boyka K.¹, Borissov, Radoslav P.¹, Vukov, Mircho I.¹

¹ Endocrinology Department, Acibadem City Clinic Tokuda Hospital,

² Clinical Laboratory Unit, Acibadem City Clinic Tokuda Hospital

Address for correspondence:

Assoc. Prof. Lachezar Lozanov, DM, PhD,
Agibadem City Clinic Tokuda Hospital Sofia
51B, „N. Vapzarov“ Blvd, 1407 Sofia
e-mail: l.lozanov@abv.bg

Submitted: 23. 10. 2020

Accepted: 01. 11. 2020

Abstract

Background. Hypothyroidism and obesity are common diseases known to influence lipid metabolism. The challenges in their co-morbidity are associated with different pathogenetic mechanisms aggravating lipid disturbances, insulin resistance and the contribution of adipokines.

The aim of the study was to investigate atherogenic lipoprotein fractions, insulin resistance indices and serum adiponectin levels in patients with hypothyroidism in relation with body weight.

Material and methods. 118 studied patients (85 females, 33 males, mean age 43±11 years) were divided into 4 age-matched groups regarding body mass index (BMI): Group A – 31 obese hypothyroid patients, Group B – 30 obese euthyroid patients, Group C – 28 hypothyroid patients with normal BMI, and Group K – 29 euthyroid individuals with normal BMI as controls. The laboratory panel included: Thyrostimulating Hormone (TSH) and Free Thyroxine (FT₄) (CMIA), Lipoprotein(a) [Lp(a)] (immune-turbidimetric enzymatic method – ITDM), Apolipoprotein B (ApoB) (ITDM), Total Cholesterol (T-Chol), Low Density Lipoprotein (LDL), Adiponectin (ELISA), Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR), standard Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) (serum glucose and insulin). Statistical analyses were performed by SPSS/Windows 13.0.

Results. Hypothyroid patients with normal BMI (Group C) revealed significantly higher median values of T-Chol, LDL, Lp(a), ApoB and Adiponectin compared to those of other groups ($p < 0,0001$). The Lp(a) median of the united hypothyroid groups (A+C) was significantly higher compared to the united euthyroid groups (B+K) whose median values were 117 and 22 mg/L, respectively ($p < 0,0001$). There was a positive correlation between TSH, ApoB and Lp(a). HOMA-IR and stimulated insulin in OGTT were significantly higher in hypothyroid than in euthyroid patients ($p < 0,001$). Adiponectin was higher in united hypothyroid patients than in the united euthyroid group ($p < 0,001$). There was a significant positive correlation between TSH and adiponectin in both hypothyroid patient groups ($\rho = 0,344$, $p < 0,001$).

Conclusion. The data showed significantly increased Lp(a) and adiponectin levels in hypothyroid patients corresponding to levels of LDL, ApoB, BMI and indices of insulin resistance. It could be assumed that increased adiponectin appeared as a compensatory reaction protecting against cardiovascular risk or may be due to adiponectin resistance.

Key words: hypothyroidism, apolipoproteins, adiponectin, insulin resistance

Introduction

Hypothyroidism and obesity are common diseases known to influence lipid metabolism. The incidence of both diseases is growing progressively worldwide, affecting over 50% of the population in terms of obesity. Hypothyroidism and obesity are common diseases

known to influence lipid metabolism. The incidence of both diseases is growing progressively worldwide, affecting over 50% of the population in terms of obesity. According to a multicenter study in 19,996 obese patients, the prevalence of manifest and subclinical hypothyroidism was 14% and 14,6%, respectively (1). The challenges in their co-morbidity are associated with

different pathogenetic mechanisms aggravating lipid disturbances, insulin resistance and chronic inflammation. Immunological tolerance can be affected both directly and indirectly by the altered secretion of adipocytokines (mainly leptin, adiponectin and visfatin) and/or cytokines (interleukin 6; IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 10 (IL-10). The end result is a transition from a Th-2 to a Th-1 immune response, the latter stimulating the manifestation of autoimmune reactions (2,3).

Hypothyroidism has a negative effect on the metabolism of lipoproteins as well as other risk factors for the development of atherosclerosis and cardiovascular complications. This is realized by several mechanisms: 1. Suppressing the activity of 3-hydroxy-3 methylglutaryl-coenzyme A-reductase, which is the first step in the biosynthesis of cholesterol; 2. Suppressing the gene expression of LDL receptors; 3. Affecting the plasma levels of lipoprotein lipase activity which increase lipoprotein residues (4).

Hypothyroidism leads to an increase in atherogenic apolipoprotein fractions such as Apolipoprotein B (ApoB) and Lipoprotein(a) [Lp(a)]. ApoB exists in two forms – ApoB100 and ApoB48, including low density lipoproteins (LDL), very low density lipoproteins (VLDL), intermediate density lipoproteins (IDL) and chylomicrons. Lp(a) is a separate subclass containing LDL-like particles and a specific apolipoprotein which is covalently bound to ApoB. It realizes the connection between lipids and blood clotting, respectively, between atherogenesis and thrombosis. A structural analogy between Lp(a) and plasminogen is established because the Lp(a) gene is generated from the duplication of the plasminogen gene (5). High Lp(a) is a prediction of early atherosclerosis independently of other risk factors, including LDL. In patients with advanced cardiovascular disease high Lp(a) indicates a coagulant risk of plaque thrombosis and also promotes the proliferation of smooth muscle cells. These unique features of Lp(a) suggest a generation of clots and atherosclerosis (6). The European Atherosclerosis Society currently recommends that patients with moderate or high risk of cardiovascular disease have their Lp(a) levels checked (7). The individual isoforms of thyroid receptors (TR) have been shown to be present in both white (WAT) and brown (BAT) adipose tissue with a predominance of T3R- β 1. T3 regulates the expression of many genes that encode lipogenesis (especially low-density LDL atherogenic lipoproteins) as well as lipolysis.

Thyroid dysfunction insulin resistance has also been associated with insulin resistance (8). TSH is associated positively with fasting and postprandial insulin levels, and negatively with insulin sensitivity, respectively. In addition, low-normal FT-4 levels are significantly associated with elevated IR (9,10).

Some studies have demonstrated that adiponectin serum levels correlate with insulin resistance in type 2 diabetic patients (8). It was shown that low adiponectin

levels and high FFA levels are associated with IR. In addition, an additive effect of low adiponectin and high FFAs with high AVF on the manifestation of IR was observed (11). These findings are supported by in vitro and in vivo studies showing that adiponectin (ADH) inhibits fatty acid synthesis and stimulates their oxidation. The key role of ADH as an insulin sensitizer in muscle, liver and adipose tissue has been demonstrated (12, 13).

Aim of the study was to investigate atherogenic lipoprotein fractions, serum adiponectin levels, and insulin resistance indices in patients with hypothyroidism in association with body weight and visceral obesity.

Material and methods

118 studied patients (85 females, 33 males, mean age 43 \pm 11 years) were divided into 4 comparable age-matched groups regarding BMI: Group A – 31 obese hypothyroid patients (24 females, 7 males, mean BMI 36,1 kg/m²); Group B – 30 obese euthyroid patients (16 females, 14 males, mean BMI 38,6 kg/m²); Group C: 28 normal weight hypothyroid patients (16 females, 12 males, mean BMI 24,8 kg/m²) and Group K: 29 normal weight euthyroid healthy volunteers as controls (19 females, 10 males, mean BMI 22,4 kg/m²). The mean waist circumference in both obese groups was 102 cm (males) and 88 cm (females).

The laboratory panel included: TSH (CMIA, reference range: 0,35-4,9 mU/L), FT₄ (CMIA, reference range 9-19 pmol/L), Lp(a) (immune-turbidimetric enzymatic method – ITDM reference range: 0-300 mg/L), ApoB (ITDM) (reference range: 0,53-1,82 g/L), total cholesterol (T-Chol, reference range: 3,5-6,2 mmol/L), low density lipoproteins (LDL, reference range: 1,8-4,1 mmol/L), high density lipoproteins (HDL, reference range: 1,0-2,1 mmol/L), adiponectin (ELISA, reference range: 7-5-8,3 μ g/mL), fasting insulin (by CMIA, reference range: 3-17,1 mU/mL), Homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR), standard oral glucose tolerance test (OGTT) (serum glucose and insulin at 0, 60, 120 min). HOMA-IR was calculated by the formula (fasting glucose multiplied by insulin divided by factor 22,5). The standard OGTT performed in all non-diabetic patients included glucose and serum insulin (basal insulin reference range 3–17,1 mIU/L). HOMA-IR \geq 2,5 and serum insulin \geq 30 mU/mL at 120 min during OGTT were accepted as indicative of insulin resistance.

Statistical data processing included: Variation and frequency analysis, independent samples T-test, One-way analysis of variance (Oneway ANOVA), non-parametric methods (Chi-square test, Fisher's exact test, Kruskal-Wallis test, Mann-Witney test), parametric coefficient of linear correlation Pearson, nonparametric coefficient of linear correlation Spearman. The critical level of significance was $\alpha=0.05$. The SPSS version- SPSS for Windows 13.0 was used for data processing. Statistical analyses were performed by SPSS for Windows 13.0.

Results

TSH mean values and standard deviations in the studied groups were as follows: Group K - $1,68 \pm 0,92$ mU/L, Group A - $12,23 \pm 11,08$ mU/L, Group B - $1,87 \pm 0,92$ mU/L, Group C - $27,93 \pm 30$ mU/L (medians: 1,40-8,88-1,65-12,57 mU/L, respectively).

The main quantitative parameters for each of the compared groups are presented at Table 1 (Table 1). Hypothyroid patients with normal body weight (Group C) revealed significantly higher mean values of total cholesterol, LDL, HDL, Lp(a) and Adiponectin compared to those of other groups ($p < 0,0001$). Their Lp(a) medians are similar (Fig. 1). The median of Lp(a) of the united hypothyroid patients' groups (A+C) is significantly higher compared to that of the united groups euthyroid participants (B+K) whose values are 117 and 22 mg/L respectively ($p < 0,0001$) (Fig. 2). A nonparametric positive correlation between TSH and cholesterol (Fig. 3) was established. ApoB and Lp(a), HOMA-IR and stimulated glucose by OGTT were significantly higher in hypothyroid than in euthyroid patients, independently of BMI ($p < 0,001$).

Adiponectin mean values and medians are much higher in united hypothyroid patients than in united euthyroid group ($p < 0,001$) (Fig. 4). There is a significant positive correlation between TSH and adiponectin in both hypothyroid patient groups ($\rho = 0,344$, $p < 0,001$) (Fig. 5).

Discussion

The data from the present study show that hypothyroidism leads to severe disorders of lipid metabolism related to atherogenic fractions of cholesterol - low-density lipoproteins. This mostly refers to Lp(a) of which

the average value in hypothyroid individuals with normal body weight (Group C) is several times higher than those in euthyroid individuals, including in cases of obesity and similar BMI (Group C). A number of studies in recent years have shown that Lp(a) is a high-risk prognostic factor for atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) and stroke, independent of other lipid parameters, including LDL (14, 15). On this basis, the European Atherosclerosis Society recommends that Lp(a) be tested in patients with moderate or high risk of CVD, with target values ≤ 14 mg/dL. The BiomarCaRE project, implemented on an European population, confirms Lp(a) as a marker for an increased risk of CV at a level > 50 mg/dL, which is in line with the recommendations of the American ACC/AHA Association (16-18). The data from the present study show much higher levels than recommended, which applies to all groups of patients studied, especially for those with hypothyroidism. They also demonstrate a negative effect of hypothyroidism on insulin sensitivity, which is consistent with data from other authors (8-10).

The effects of thyroid hormones on adiponectin gene expression in thyroid dysfunction remain unclear (19). Data on the role of thyroid hormones in relation to adiponectin are contradictory. Some studies have found reduced adiponectin in hypothyroidism, others found no significant differences from euthyroid individuals. Studies in experimental animals have shown elevated serum levels of adiponectin in hypothyroid dogs and guinea pigs and their reduction after levothyroxine replacement (20). The same effect of replacement therapy on adiponectin levels has been described in people with overt hypothyroidism. In the present study, we found elevated adiponectin levels in both hypothyroid groups (A+C). Given that adiponectin is a proven

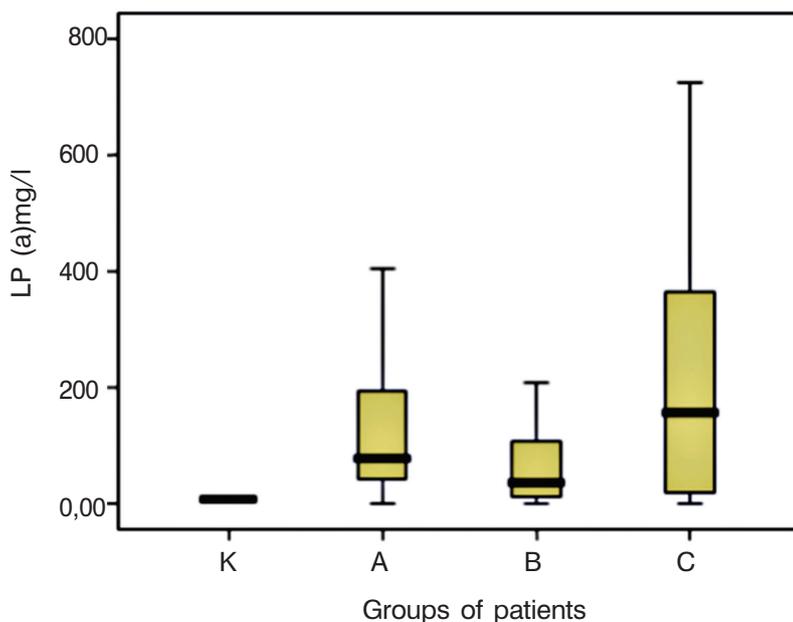


Figure 1.

Medians of Lp(a) of the studied groups: Group K - normal weight euthyroid controls; Group A - obese hypothyroid patients; Group B - obese euthyroid patients; Group C - normal weight hypothyroid patients.

Table 1. Mean values and medians of the quantitative variables in the studied groups.

Variables		Patient groups				Difference	Test	P
		K	A	B	C			
Count		29	31	30	28			
Cholesterol (mmol/l)	Mean	4,9	5,4	5,9	6,4	*	KW	0,001
	± SD	0,78	1,06	0,93	2,32			
	Median	4,82	5,53	5,8	5,79			
3-glycerides (mmol/l)	Mean	1,48	1,70	1,58	1,25			
	± SD	0,285	1,061	0,831	0,659			
	Median	1,48	1,32	1,37	1,1			
LDL (mmol/l)	Mean	1,14	3,17	3,51	3,70	*	KW	<0,0001
	± SD	0,806	0,673	0,666	1,627			
	Median	0,84	3,1	3,45	3,15			
HDL (mmol/l)	Mean	2,51	1,30	1,23	1,64	*	ANOVA	<0,0001
	± SD	0,561	0,306	0,234	0,431			
	Median	2,33	1,2	1,185	1,615			
ApoB (g/l)	Mean	0,97	1,00	1,15	1,06	*	KW	0,005
	± SD	0,136	0,218	0,210	0,479			
	Median	1,02	1,0	1,1	0,93			
LP(a) (mg/l)	Mean	7,4	131,2	92,4	207,3	*	KW	0,012
	± SD	5,73	118,63	138,42	199,78			
	Median	7,35	77,9	36,5	156,6			
HOMA-IR	Mean	1,48	4,82	5,10	1,55	*	KW	<0,0001
	± SD	0,71	3,56	2,85	1,01			
	Median	1,3	3,14	4,36	1,39			
Adiponectin (mg/l)	Mean	6,0	11,6	7,5	19,1	*	KW	<0,0001
	± SD	4,14	7,01	4,39	10,96			
	Median	5,0	10,5	6,87	15,25			

Significant differences between at least one pair of the groups for which respective tests are marked with (*).

protective factor for cardiovascular disease, it can be assumed that elevated levels of adiponectin in hypothyroidism are a compensatory response to reduce cardiovascular risk or are due to resistance to adiponectin receptors. Further clinical studies are needed on the role of adiponectin and its relationship to atherogenic lipoproteins in hypothyroidism, as well as on the effect of levothyroxine replacement therapy on these parameters (21).

Conclusion

The data from the study show that hypothyroidism is an important pathogenetic factor for the manifestation of metabolic disorders that lead to a significant increase in atherogenic apolipoproteins, especially Lp(a),

significantly increasing cardiovascular risk. Elevated adiponectin levels may be considered as a compensatory response or may be due to resistance to adiponectin receptors. This is associated with a decrease in insulin sensitivity and a tendency to increase body weight and other atherogenic factors.

Declaration of interest. All authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of this research.

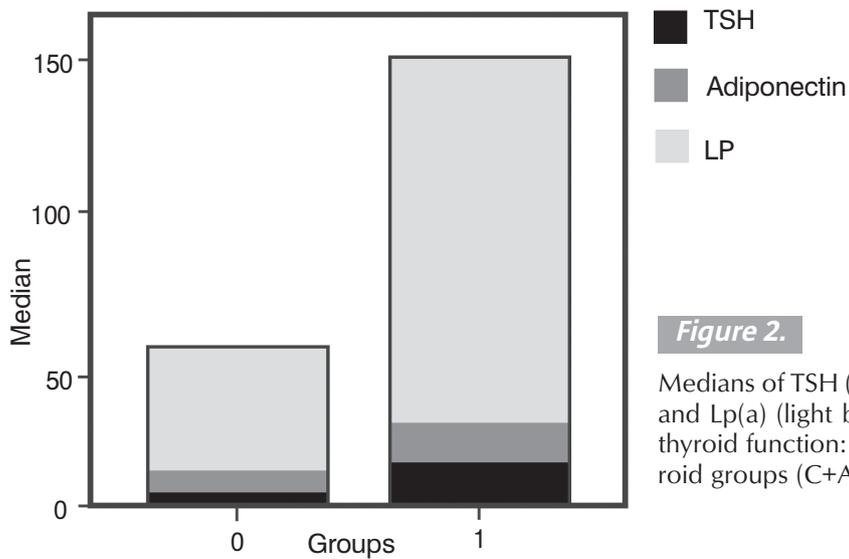


Figure 2.

Medians of TSH (dark blue colored), Adiponectin (green) and Lp(a) (light blue) in the united groups according to thyroid function: 0 - euthyroid groups (K+B); 1- hypothyroid groups (C+A).

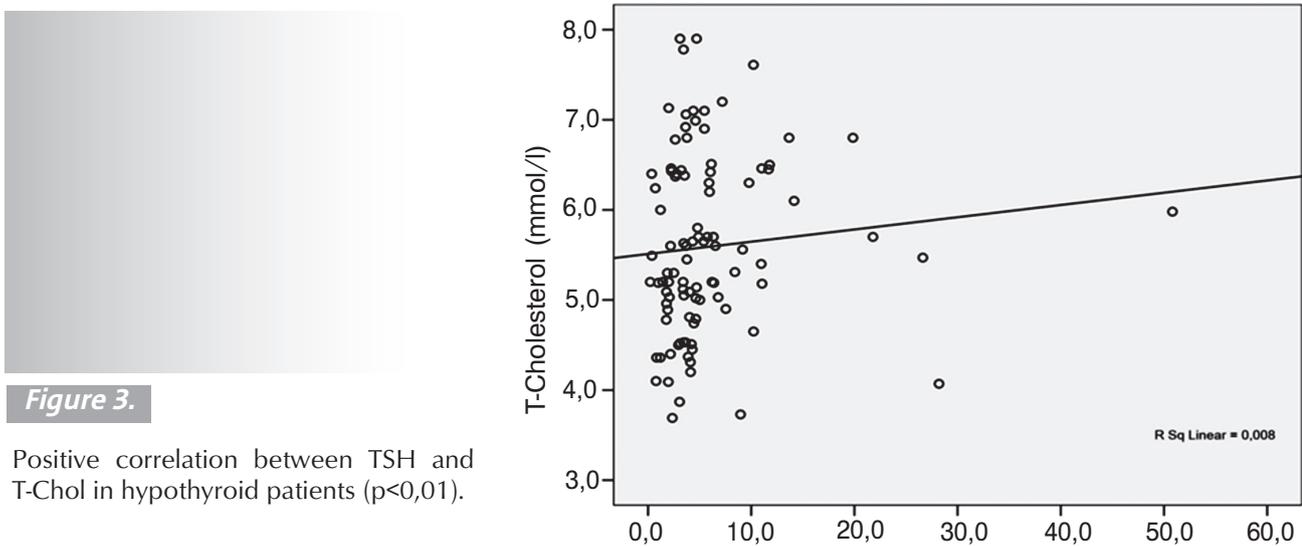


Figure 3.

Positive correlation between TSH and T-Chol in hypothyroid patients ($p < 0,01$).

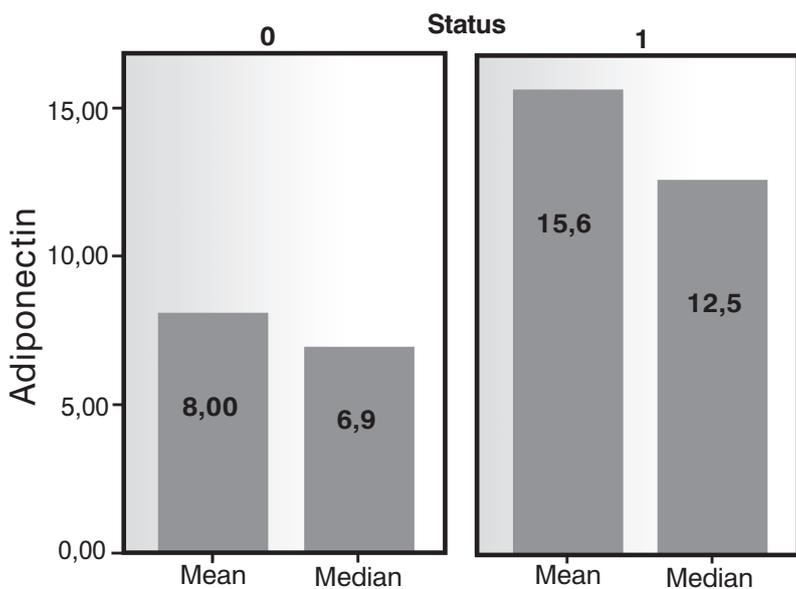
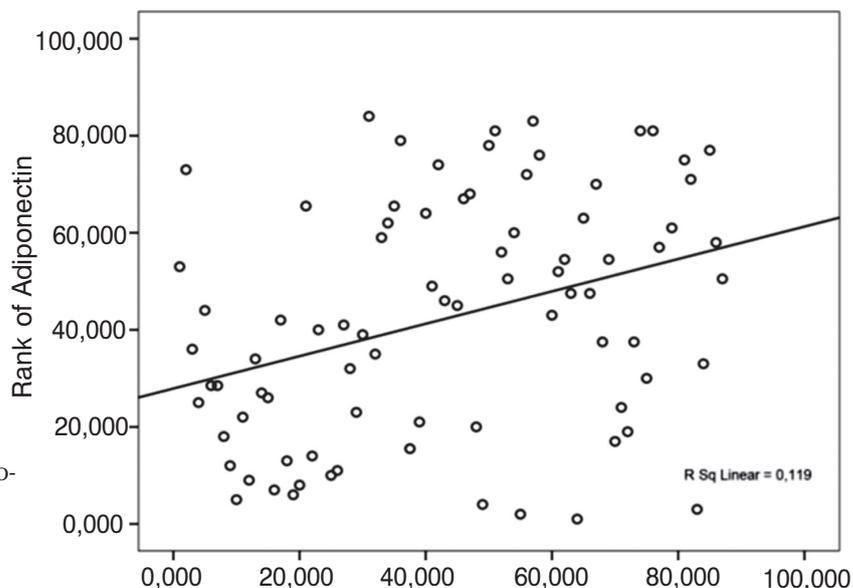


Figure 4.

Adiponectin mean values and medians in the united euthyroid and hypothyroid groups: 0 - euthyroid groups (K+B); 1- hypothyroid groups (C+A) ($p < 0,001$).

Figure 5.

Adiponectin/TSH correlation in hypothyroid patients' groups (A+C).



References

1. Van Hulsteijn LT, Pasquali R, Canasueva E, Haluzik M, Ledoux S, Monteiro MP, et al. Prevalence of endocrine disorders in obese patients: systematic review and meta-analysis. *Europ J Endocrinol* 2020; 182 (1): 11-21.
2. Fotanelle LC, Feitosa MM, Severo JS, Freitas TEC, Moraes JBS, Torres-Leal FL, et al. Thyroid Function in Human Obesity: Underlying Mechanisms. *Horm Metab Res* 2016; 48: 787-794.
3. Cinar N, Gurlek A. Association between novel adipocytokines adiponectin, vaspin, visfatin and thyroid: An experimental and clinical update. *Endocrin Connect* 2013; 2(4): 30-38.
4. Ting J, Xiaochun J. Update on Lipid Metabolism and Thyroid Disorders. *Endocrinol Obes* 2014; 2(3): 1043.
5. Tzotzas T, Krassas GE, Konstantinidis T, Bougoulia M. Changes in lipoprotein (a) levels in overt and subclinical hypothyroidism before and during treatment. *Thyroid* 2000; 10: 803-808.
6. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Boren J, Andreotti F, Watts GF, et al. Lipoprotein (a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J* 2010; 31(23): 2844-2853.
7. A joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and the European Federation of Chemistry and Laboratory Medicine. *Eur Heart J* 2016; 37(25): 1944-1958.
8. Aleidi S, Issa A, Bustanji H, Khalil M, Bustanji Y. Adiponectin serum levels correlate with insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Saudi Pharm J* 2015; 23(3): 250-256.
9. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Castro A, Casamitjana R, Ricart W. Thyroid function is intrinsically linked to insulin sensitivity and endothelium-dependent vasodilation in healthy euthyroid subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3337-3343.
10. De Pergola G, Ciampolillo A, Paolotti S, Trerotoli P, Giorgino R. Free triiodothyronine and thyroid stimulating hormone are directly associated with waist circumference, independently of insulin resistance, metabolic parameters and blood pressure in overweight and obese women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007; 67: 265-269.
11. Medina-Urrutia A, Posadas-Romero C, Posadas-Sánchez R, Jorge-Galarza E, Villarreal-Molina T, González-Salazar MC, et al. Role of adiponectin and free fatty acids on the association between abdominal visceral fat and insulin resistance. *Cardiovasc Diabetol* 2015; 14: 20.
12. Fisman EZ, Tenenbaum A. Adiponectin: a manifold therapeutic target for metabolic syndrome, diabetes, and coronary disease? *Cardiovasc Diabetol* 2014; 13: 103.
13. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 2014; 53: 124-144.
14. Wilson DP, Jacobson TA, Jones PH, Koschinsky ML, McNeal CJ, Nordestgaard BG, Orringer CE. Use of Lipoprotein (a) in clinical practice: a biomarker whose time has come. A scientific statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol* 2019; 13: 374-392.
15. Bittner VA, Szarek M, Aylward PE, Bhatt DL, Diaz R, Edelberg JM, et al. Effect of Alirocumab on Lipoprotein (a) and Cardiovascular Risk After Acute Coronary Syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2020; 75: 133-144.
16. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. ESC Scientific Document Group 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2020; 41(1): 111-188.
17. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA. Guideline on the management of blood cholesterol: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2019; 73: 285-350.
18. Frasz Z. Increased cardiovascular risk associated with hyperlipoproteinemia (a) and the challenges of current and future therapeutic possibilities. *Anatol J Cardiol* 2020; 23(2): 60-69.
19. Abdel Salami M, Edrees HM. Effect of Different Conditions of Thyroid Function on Serum Adiponectin, Visfatin and Vaspin Levels in Rats. *Basic Sci Med* 2015; 4(1): 12-19.
20. Mazaki-Tovi M, Abbod S, Kol A, Farkas A, Schenck PA. Increased Serum Concentration of Adiponectin in Canine Hypothyroidism. *Veterinary Journal* 2015; 203(2): 253-255.
21. Sun X, Feng X, Tan W, Lin N, Hua M, Wei Y, et al. Adiponectin exacerbates collagen-induced arthritis via enhancing Th-17 response and promoting RANKL expression. *Sci Rep* 2015; 11(5): 11296.

Приложение на хормоните на щитовидната жлеза при хипотиреоидни и еутиреоидни пациенти: анкетно проучване THESIS* сред български лекари

*THESIS: Лечение на хипотиреоидизма в Европа от специалисти: международно проучване

Борисова, Анна-Мария И.¹, Боянов, Михаил А.², Атанасио, Роберто³, Хезедуш, Ласло⁴, Нази, Ендре⁵, Негро, Роберто⁶, Папини, Енрико⁷, Перос, Петрос⁸

¹Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Софиямед“, Медицински факултет, Софийски университет „Свети Климент Охридски“, София, България

²Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Александровска“; Катедра Вътрешни болести, Медицински университет, София, България

³Endocrine Unit, Galeazzi Orthopedic Institute IRCCS, 20161 Milan, Italy

⁴Department of Endocrinology and Metabolism, Odense University Hospital, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

⁵Division of Endocrinology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

⁶Division of Endocrinology, V. Fazzi Hospital, Lecce, Italy

⁷Department of Endocrinology and Metabolism, Regina Apostolorum Hospital, Albano, Rome, Italy

⁸Department of Endocrinology, Royal Victoria Infirmary, Newcastle upon Tyne, United Kingdom

Адрес за кореспонденция:

Проф. д-р Михаил Боянов

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната,
УМБАЛ „Александровска“; Катедра по Вътрешни болести,
Медицински Университет, София;

Бул. „Свети Георги Софийски“ 1, София 1431;

e-mail: mihailboyanov@yahoo.com

Постъпване: 06. 10. 2020

Ревизиране: 16.11.2020

Приемане: 28.11.2020

Резюме

Цел на проучването: да изследва приложението от страна на българските лекари на щитовидни хормони при хипотиреоидни и еутиреоидни пациенти с фокус върху фармацевтичните форми на Левотироксин (LT₄).

Материал и методи: Проучването е срезово, с анкетен метод. Участваха 120 лекари (88 жени и 32 мъже), 62,4% от които на възраст над 50 години. Ендокринологите съставляваха 74% от анкетираните, а останалите бяха общопрактикуващи лекари, интернисти и малко други специалисти. На български език беше адаптиран оригиналният въпросник от международното проучване THESIS. Първата част съдържа 8 въпроса, които целят да идентифицират профила на анкетираните лекари (пол, възраст, специалност, трудов стаж, тип медицинска практика, оборот на пациенти с тиреоидни заболявания). Втората същинска част съдържа общо 24 въпроса, които изясняват практиките и предпочитанията при лечение на хипотиреоидизма. Статистическата обработка се извърши с програмата IBM SPSS 19.0 for Windows.

Резултати: Една трета (33,3%) от участниците не биха препоръчали LT₄ на еутиреоидни пациенти. 96% приемат, а 100% изписват LT₄ като средство на първи избор за заместително лечение при хипотиреоидизъм. Малка част от отговорилите (10%), обаче, намират място и за изписване на трийодтиронин (LT₃) или комбинация от LT₃ и LT₄ (6%). Таблетките левотироксин са предпочитана форма според над половината от отговорилите, но 1/5 биха предложили меки капсули, около 1/6 – течен разтвор. 52,5% не биха ползвали йод или селен; 34,2% биха препоръчали комбинирано лечение с LT₄ + LT₃ за

кратък период от време при протрахиран хипотиреоидизъм и 24,2% – при наличие на симптоми за хипотиреоидизъм на фона на нормален тиреостимулиращ хормон. Като основни причини за продължаваща симптоматика на пациентите въпреки добрия хормонален контрол се изтъкват придружаващите заболявания, психосоциалните фактори, синдромът на хронична умора и нереалистичните очаквания. Шестнадесет лекари (13,3%) са съобщили, че самите те имат поставена диагноза хипотиреоидизъм и 43,8% от тях изпитват прекомерна слабост/уморяемост. 25% от тях биха опитали комбинирано лечение или лечение с изсушен екстракт (общо 4 лекари).

Заклучение: LT_4 е основният медикамент, прилаган за лечение на хипотиреоидизма у нас. Съчетанието $LT_4 + LT_3$ и изсушеният екстракт намират място в практиката на някои лекари. Проучването показва разликата между ръководствата за добра клинична практика и реалния живот.

Ключови думи: хипотиреоидизъм, левотироксин, клинична практика, анкета

Въведение

Хипотиреоидизмът е една от най-често срещаните ендокринни дисфункции. В световен мащаб се смята, че 2% до 6% от жените ще развият хипотиреоидизъм в хода на живота си, като в около $\frac{2}{3}$ от случаите ще се касае за субклиничен хипотиреоидизъм, а голям брой случаи ще останат и недиагностицирани (1). В различни проучвания се открива нарастване на честотата на хипотиреоидизма сред възрастното население. При преглед на база данни за лица на възраст ≥ 65 години в САЩ се установява, че за периода 2007–2015 г. честотата на хипотиреоидизма е нараснала от 5,62% на 8,24% (2). При това 28,0% от пациентите не са получавали заместително лечение, а при 17,4% стойностите на тиреостимулиращия хормон (ТСХ) са били над препоръчаните (2). В проучване сред 2402 случайно избрани лица (1347 жени, 1055 мъже) през 2006 г. у нас са установени 3,2% субклиничен и 0,9% клинично изявен хипотиреоидизъм, като 61,7% от тях са били новодиагностицирани (3). През 2012 г. се провежда ново епидемиологично проучване сред 2032 лица и се установяват още по-високи честоти на хипотиреоидизма (4). Субклиничен хипотиреоидизъм е бил установен при 4,5 % от жените и 2% от мъжете, а клинично изявен – съответно при 3,2% и 1,1%.

Проблемът йоден дефицит е бил обявен за решен през 2005 г., благодарение на въведеното през 1994 г. универсално йодиране на солта с КЈОЗ (5). Национално представително проучване, включващо 3939 ученици на възраст 7-11 години (равен брой момичета и момчета) от осем ендемични и две неендемични области, установява медиана на йодурията от 198 $\mu\text{g/L}$, като само 6,9% от пробите са били под 100 $\mu\text{g/L}$ (6). Съвсем скорошно срезово, многоцентрово проучване сред общото население е включило 547 бременни жени (средна възраст 30 ± 5 г.) от 10 региона на

България и отчита средно ниво на йодурията от $181, 6 \pm 94,0 \mu\text{g/L}$, с медиана от 170 $\mu\text{g/L}$ (95% CI: 161-177) (7).

Лечението на хипотиреоидизма е разгледано в множество съвременни Препоръки и Методически указания, включително и в Българското указание за добра клинична практика от 2019 г. (1, 8-11). Заместителното лечение на хипотиреоидизма се базира основно на приложението на левотироксин и са фиксирани и целевите стойности на ТСХ (11, 12). Въпреки всички усилия за стандартизация и опростяване на това лечение, редица въпроси продължават да създават поле за дискусия.

От една страна трудност създават различните практики на лекарите в отделните страни, както и разликите в поведението на общопрактикуващите лекари и специалистите ендокринологи (2, 13-15). У нас мнозинството пациенти с хипотиреоидизъм се лекува от ендокринологи в специализирани практики. Почти всички такива пациенти ползват възможностите на общественото здравеопазване. Все по-нарастващата употреба на Левотироксин (LT_4) се дължи гонякъде и на понижаване на прага, прилаган за започването му от лекарите като не отчитаме препоръките за бременни жени (16).

От друга страна, в последното десетилетие нараства разочарованието на пациентите от резултатите на лечението с левотироксин, независимо от добрите биохимични резултати (17, 18). Скорошно британско онлайн-проучване открива висока честота на разочарование от лечението при пациенти с хипотиреоидизъм – 77,6%; а общата оценка за качеството на живот е била доста ниска (19). Заслужава да се отбележи, че удовлетворението на пациентите от лечението не е имало връзка с вида на прилаганите щитовидни хормони (19). Подобни феномени намаляват придържането към лечението (20), а това от своя страна води до нужда от проучва-

ния върху приложението на щитовидни хормони при хипо- и еутиреоидни пациенти (21, 22).

На трето място, в редица европейски страни през последните години навлязоха различни фармацевтични форми на левотироксин (генерични или брандирани, под формата на таблетки, капсули с гел или готов разтвор). Поставя се въпросът за биоеквивалентността на различните форми (23, 24), както и за превъзходството на капсулите или течния разтвор на левотироксин в определени клинични ситуации (25-28). Скорошно проучване разглежда въпроса за възможните ползи от тези нови фармацевтични форми и стига до извода, че научните данни, подкрепящи предимството на течните или капсулни форми на LT_4 в сравнение със стандартната таблетна форма, са твърде слаби (29). Независимо от приетите препоръки и указания за лечение на хипотиреоидизма, продължава да се коментира приложението на трийодтиронин или дори на сух извлек от щитовидна жлеза (30, 31). У нас за употреба са налице само 2 таблетни форми на LT_4 от два различни производителя.

Изследването на предпочитанията на лекарите е важно, защото то влияе на разходите за здравеопазване и опита на пациентите. Изборът на лечение от лекаря се влияе много силно от продължаващата симптоматика и характеристика на пациента, независимо от биохимичните данни за контрол на хипотиреоидизма (32). До момента не са били загълбочено изследвани предпочитанията на лекарите при изписване на различните форми на LT_4 в контекста на персистиращи симптоми на пациента. Би било много важно да се знае дали има разлики в опита и практиките в различните европейски страни. Пилотно проучване с анкетен метод на Италианското дружество на клиничните ендокринологи (22) даде тласък за организиране на международен проект в редица европейски страни с общо 28 страни-участнички, наречено THESIS (Treatment of Hypothyroidism in Europe by Specialists: an International Survey) и подкрепено от IBSA Institut Biochimique SA, в което покана за участие получи и Българско дружество по ендокринология.

Целта на настоящото анкетно проучване да изследва приложението от страна на българските лекари на щитовидни хормони при хипо- и еутиреоидни пациенти с фокус върху фармацевтичните форми на Левотироксин (LT_4).

Материали и методи

Описание на прилаганата анкета

Настоящото проучване представлява българското участие в споменатия международен проект THESIS. Касае се за анкетно проучване

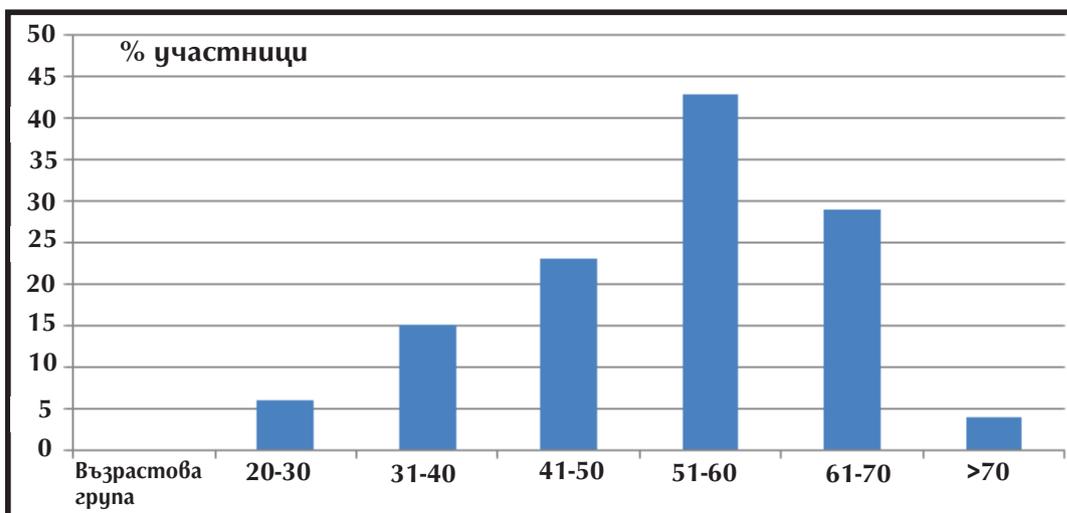
с доброволно участие на лекари, които диагностицират и лекуват хипотиреоидизъм. За целта беше преведен и редактиран на български език унифицираният въпросник от проучването THESIS. Въпросникът съдържа 2 части. Първата персонална част съдържа 8 въпроса, които целят да идентифицират профила на анкетираните лекари (пол, възраст, специалност, трудов стаж, членство в професионални гружества, тип медицинска практика, оборот на пациенти с тиреоидни заболявания). Втората същинска част съдържа общо 24 въпроса, които изясняват практиките и предпочитанията при лечение на хипотиреоидизма у нас. Част от въпросите позволяват избор на повече от един верен отговор, а някои дават възможност и за отговор в свободна форма. Изясняват се показанията за изписване на тиреоидни хормони при еутиреоидни пациенти, както и предпочитанията тиреоиден хормон (LT_4 – левотироксин, LT_3 – трийодтиронин), изсушен извлек от щитовидна жлеза (thyreoidea siccata) или съчетание от LT_4 + LT_3 . Погребно се изследват вижданията за разликите в приложението на таблетките, меките капсули с гел или течния разтвор: вариабилност в абсорбцията, при непоносимост към храни или стомашно-чревни заболявания, при невъзможност за прием на гладно или при необяснимо лош хормонален контрол. Изследва се преминаването от една форма към друга, както и честотата на проследяване на ТСХ. Един въпрос се фокусира върху изписването на хранителни добавки, например йод или селен, а друг – върху съчетаното лечение. Четири въпроса разглеждат случаите на пациенти с добър хормонален контрол, но с продължаваща симптоматика, като в два от тях анкетираният подрежда отговорите според тяхната вярност (вероятност). Пет въпроса касаят наличието на хипотиреоидизъм у самите анкетираните лекари, както и вида лечение, което приемат и ефектите от него.

Участници

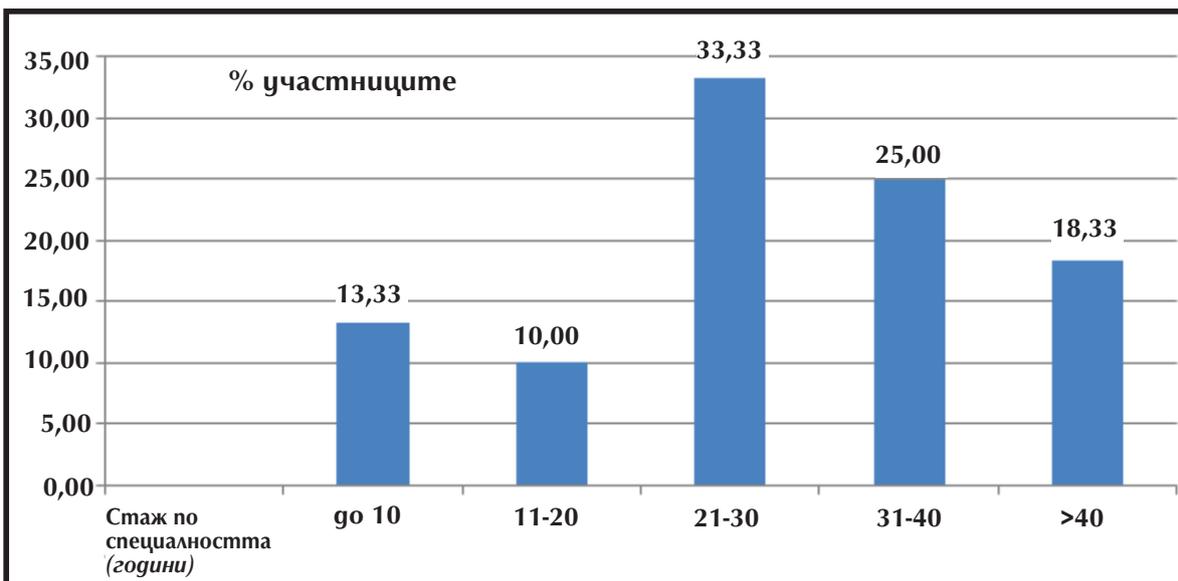
Сто двадесет и шест лекари бяха поканени за участие по телефона на случаен принцип – основно от практикуващите 440 члена на Българското дружество по ендокринология. След получено съгласие по e-mail им бе изпратен въпросникът. Шест лекари (4,76%) не върнаха попълнен въпросник и отпаднаха. Така, общо 120 лекари (95,2%) върнаха попълнен въпросник и участваха в анкетното проучване. Първият въпросник бе изпратен по електронната поща на 7 юли, а последният попълнен бе получен на 30 юли 2020 г. Не са изпращани напомнания. По този начин събирането на данни отне 24 дни и отговорите се въведоха в таблица EXCEL. Прегледът от експерт статистик и изчислването на

Фигура 1.

Възрастово разпределение на анкетираните.



Фигура 2. Разпределение на анкетираните по трудов стаж като лекари.



данните отне още една седмица. Проучването приключи на 6 август 2020 г. и продължи общо 30 дни.

Статистическа обработка

Тя се извърши от експерт по медицинска статистика с използване на програмата IBM SPSS 19.0 for Windows. Извършен бе дескриптивен и честотен анализ на разпределението на отговорите. При въпросите с повече от един възможен отговор общият сбор надхвърляше 100%.

Резултати

Участващи лекари

В анкетата реално участваха 120 лекари – 88 жени (77,3%) и 32 мъже (26,7%), които предадоха изцяло попълнен въпросник. Възрастовото раз-

пределение на участниците е показано на Фигура 1 (Фиг. 1).

Преобладаваха жените, както и лекарите на възраст над 50 години и с над 20-годишна практика по специалността. Трудовият стаж на участниците е показан на Фигура 2 (Фиг. 2).

Останалите професионални характеристики на участниците са показани в Таблица 1. 44% от участниците имаха 2 специалности – вътрешни болести плюс ендокринология и болести на обмяната, като ендокринолозите бяха общо 74,0% (89 от 120 души, от които трима – детски ендокринолози). Участниците-ендокринолози съставляваха 20,2% от практикуващите членове на БДЕ (Табл. 1).

Таблица 1 показва, че е налице равномерно разпределение на участниците в различни видове медицински практики. Мнозинството са имали

Таблица 1.

Професионални характеристики на участниците (специалности, вид медицинска практика, оборот на тиреоидни пациенти).

Характеристики	Възможни отговори	Брой (%)
Специалност	Ендокринология	86 (71,66)
	Вътрешни болести	68 (56,66%)
	Детска ендокринология	3 (2,5%)
	Обща медицина	17 (14,66%)
	АГ	1 (0,83%)
	Други	13 (10,83%)
Място на практиката	Университетска болница	29 (24,16%)
	Общинска болница	41 (34,16%)
	Частна клиника	35 (29,16%)
	ОПЛ	1 (17,5%)
	Изследователски център	2 (1,66%)
Лечение на тиреоидни пациенти	Ежедневно	73 (60,84%)
	Ежеседмично	31 (25,83%)
	По-рядко	16 (13,33%)
Брой на лекуваните тиреоидни пациенти	10-50/ година	27 (22,5%)
	51-100/ година	23 (19,17%)
	>100/ година	65 (54,17%)
	По-малко	5 (4,16%)

Таблица 2.

Предпочитанията относно избора на вид щитовиден хормон - LT_4 (левотироксин), LT_3 (трийодтиронин), изсушен извлек от щитовидна жлеза (*thyreoidea siccata*) или съчетание от LT_4 и LT_3 . (Общият сбор от процентите може да надхвърли 100, защото част от отговорилите са посочили по няколко отговора).

Въпрос	Възможни отговори	Брой отговорили (%)
Кое трябва да бъде избор на първа линия?	LT_4 (levothyroxine) LT_3 (triiodothyronine) Изсушен извлек Съчетание от LT_4 + LT_3	115 (95,84%) 1 (0,83%) 1 (0,83%) + 3 (2,5%)
Кои средства изписвате в практиката?	LT_4 (levothyroxine) LT_3 (triiodothyronine) Изсушен извлек Съчетание от LT_4 + LT_3	120 (100%) 12 (10%) - 7 (5,83%)

богат опит в лечението на заболяванията на щитовидната жлеза. Членство в Европейската тиреоидна асоциация са посочили 11 участника (9,17%), а в Българското дружество по ендокринология – 88 (73,3%).

Предпочитани практики при лечение на хипотиреоидизма

Избор на вид щитовиден хормон

Предпочитанията относно избора на вид щитовиден хормон – LT_4 (левотироксин), LT_3 (трийодтиронин), изсушен извлек от щитовидна жлеза (*thyreoidea siccata*) или съчетание от LT_4 и LT_3 – са показани в Таблица 2.

Както се вижда от Таблица 2, почти всички

отговорили приемат и изписват левотироксин като средство на първи избор за заместително лечение при хипотиреоидизъм. Част от отговорилите, обаче смятат, че има място и за изписване на трийодтиронин или комбинация от LT_3 и LT_4 . Изглежда, че изсушеният извлек не се прилага изобщо в настоящата клинична практика (Табл. 2).

Лечение с тиреоидни хормони на еутиреоидни пациенти

Показанията за лечение с тиреоидни хормони при еутиреоидни пациенти са обобщени според отговорите на анкетиранията в Таблица 3. Някои от тях са посочили повече от 1 верен от-

Таблица 3. Показания за лечение с тиреоидни хормони при еутиреоидни пациенти според отговорите на анкетираниите

Показания	Отговорили, брой (%)
Необяснима умора	11 (9,2%)
Затлъстяване, неотговарящо на стила на живот	19 (15,8%)
Изразена хиперхолестеролемия – като допълващо лечение	17 (14,2%)
Резистентна на антидепресанти депресия	
Инфертилитет при жени с високи титри на тиреоидни антитела	21 (17,5%)
Нарастваща във времето обикновена гуша	66 (55,0%)
Не, няма показания за лечение на такива пациенти	40 (33,3%)

Таблица 4. Предпочитания на българските лекари относно приложението на левотироксин като таблетка, мека капсула с гел или течен разтвор.
(Някои са посочили повече от 1 верен отговор – въпросът е отбелязан с *).

Избор на форма на левотироксин при различни клинични ситуации	Възможни избори	Отговорили, брой (%)
1. Пациент, който съобщава за непоносимост към различни храни, допускаща наличие на целиаккия, малабсорбция, непоносимост към лактоза или често използвани коригенци *	Таблетки Меки капсули с гел Течен разтвор Не се очакват разлики при различните форми	76 (63,3%) 20 (16,7%) 27 (22,5%) 16 (13,3%)
2. Пациент, приемащ генеричен T ₄ с необяснимо лош хормонален контрол на хипотиреоидизма *	Таблетки Меки капсули с гел Течен разтвор Не се очакват разлики при различните форми	59 (49,2%) 20 (16,7%) 18 (15,0%) 35 (29,2%)
3. Пациент с лош хормонален контрол който не може да приема LT ₄ на гладно и отделно от напитки и храна (поради висока заетост)	Таблетки Меки капсули с гел Течен разтвор Не се очакват разлики при различните форми	50 (41,7%) 21 (17,5%) 19 (15,8%) 35 (29,2%)
4. Пациент, приемащ T ₄ с оптимален хормонален контрол, но с продължаващи симптоми	Таблетки на друг производител Меки капсули с гел Течен разтвор Не се очакват разлики при различните форми	60 (50%) 8 (6,7%) 9 (7,5%) 43 (35,8%)

говор, така че сборът от процентите на места надхвърля 100% (Табл. 3).

Предпочитана фармацевтична форма на левотироксин

В Таблица 4 са представени предпочитанията на българските лекари относно приложение-

то на левотироксин като таблетка, мека капсула с гел или течен разтвор.

Анкетираниите подкрепят възможните фармацевтични форми на LT₄ с най-малка вариабилност на абсорбцията, както следва: таблетка (n=68; 56,6%), капсули с гел (n=14; 11,7%), течен

Таблица 5. Възможни показания за съчетано лечение с $LT_4 + LT_3$. Някои от анкетиранияте са избрали повече от 1 отговор.

Възможни показания	Отговорили, брой (%)
За кратко време, при пациенти след протрахиран хипотиреоидизъм	41 (34,2%)
При пациенти с нормално ТСХ, но персистиращи оплаквания като при хипотиреоидизъм	29 (24,2%)
При пациенти с нормално ТСХ, но с необяснимо наддаване на телесно тегло	8 (6,7%)
Поради ниското качество на доказателствата, такова лечение не бива да се прилага	48 (40%)

Таблица 6. Впечатления на анкетиранияте относно персистиращата хипотиреоидна симптоматика на фона на нормално ТСХ.

Впечатление	Възможни отговори	Брой отговорили (%)
Честота на подобни случаи	<5%	50 (41,7%)
	6-10%	41 (34,2%)
	11-30%	8 (6,6%)
	Над 30%	3 (2,5%)
	Не съм сигурен	18 (15,0%)
Тенденция в честотата на подобни случаи	Срещам все повече	32 (26,6%)
	Срещам все по-малко	17 (14,2%)
	Няма промяна	42 (35,0%)
	Не съм сигурен	29 (24,2%)

разтвор ($n=11$; 9,2%). 27 участника (22,5%) не очакват наличие на съществена разлика между отделните форми (Табл. 4).

Контролиране на ТСХ

При започване на заместително лечение с LT_4 6 лекари (5%) бяха проконтролирали ТСХ след 2 седмици, 76 отговорили (63,3%) – след 4-6 седмици, 38 (31,7%) – след 8 седмици. При промяна на фармацевтичната форма или препарат на LT_4 63 от отговорилите (52,5%) контролират нивото на ТСХ след 4-6 седмици, 35 (29,2%) – след 8 седмици, 10 (8,3%) – според клиничната преценка, а 12 души (10,0%) не го контролират въобще.

Хранителни добавки (йод, селен)

Относно хранителните добавки (селен или йод) някои от анкетиранияте са посочили повече от един отговор. Мнозинството от отговорилите (63 души – 52,5%) не бяха ги ползвали никога, но 18 души (15,0%) бяха ги ползвали при съпътстващ аутоимунен тиреоидит, 36 души (30,0%) – при поискване от страна на пациента

като допълващо лечение и 7 души (5,8%) – при субклиничен хипотиреоидизъм.

Съчетано лечение с $LT_4 + LT_3$

Отговорите относно показанията за такова съчетано лечение са обобщени в Таблица 5 (Табл. 5).

Персистираща симптоматика и качеството на живот на пациентите

Впечатленията на анкетиранияте относно персистиращата хипотиреоидна симптоматика на фона на нормално ТСХ са обобщени в Таблица 6 (Табл. 6).

Основните причини за продължаващите симптоми на фона на еутиреоидизъм бяха посредствени от анкетиранияте в намаляващ ред на тяхната значимост (принос): психо-социални фактори, съпътстващите заболявания, неспособността на левотироксина да възстанови нормалната физиология, синдром на хроничната умора и нереалистичните очаквания на пациента (Табл. 7).

Близо 50% от лекарите не считат, че умората

се дължи на неспособността на левотироксина да възстанови нормалната физиология, а над половината изтъкват ролята на тежестта от хроничен прием на лекарства. Помолени да подредят възможните обяснения за персистиращите симптоми на пациентите с постигнато нормално ТСХ на фона на лечение с Левотироксин, анкетираните предложиха подредбата, посочена в Таблица 8 (Табл. 8).

Поведение при наличие на хипотиреоидизъм у самия анкетиран лекар

Сред анкетираните 16 души (13,3%) са съобщили, че самите те имат поставена диагноза хипотиреоидизъм, налагащ лечение с тиреоидни хормони. От тях 7 души (43,8%) усещат прекомерна уморяемост/слабост, двама (12,5%) са опитвали комбинирана терапия с LT_3 и LT_4 и двама (12,5%) дават положителен отговор относно опит за самолечение с изсушен екстракт. От лекарите без хипотиреоидизъм 15% заявяват, че биха опитали комбинирано лечение или лечение с изсушен екстракт.

Отговори в свободен текст относно лечението с комбинирани форми или изсушен екстракт от щитовидна жлеза

В отговорите под форма на свободен текст най-често срещаните твърдения са, че все пак левотироксинът е утвърдената форма за терапия на хипотиреоидизма, че опитът с комбинирани форми е малък (и поради липсата на съчетани форми или самостоятелен LT_3 в аптечната мрежа у нас) и че лечението с изсушения екстракт е демодулирано и не е добре стандартизирано.

Мултивариабилен анализ на отговорите в зависимост от възрастта, пола, специалността и вида практика на анкетираните

Този анализ не показва значими разлики в отговорите на анкетираните поради малкия брой участници в отделните подгрупи и големия брой възможни отговори по всеки въпрос. Все пак, беше възможно да се открият някои тенденции. Възрастта и продължителният стаж на анкетираните повлиява тяхното възприятие на възможните причини за персистиращи симптоми при лекувани с левотироксин пациенти, които са достигнали нормално ТСХ (въпроси В16, В17). Видът тяхна специалност влияе на вижданията за приложение на щитовидни хормони при еутиреоидни пациенти, на избора на първо средство за заместително лечение на хипотиреоидизма, както и на приложението на хранителни добавки като йод и селен (въпроси В1, В2, В12).

Обсъждане

Настоящото проучване е първо по рода си сред българските лекари и по-специално сред ендокринолози. Резултатите от анкетата показват, че левотироксинът е основният медика-

мент, прилаган за лечение на хипотиреоидизма. Независимо от липсата им в нашата страна, съчетаните форми на тиреоидните хормони и изсушеният екстракт намират все пак място в практиката на някои лекари. Като причина се изтъкват основно някои придружаващи хипотиреоидизма заболявания, както и продължаващата симптоматика на фона на оптимално лечение с левотироксин. Когато самите анкетиранци имат хипотиреоидизъм, почти $1/2$ споделят за слабост/уморяемост, а $1/8$ съобщават за опити върху себе си с комбинирано лечение или изсушен екстракт. Така проучването *показва разликата между ръководствата за добра клинична практика и реалния живот*.

По принцип, почти всички ръководства отхвърлят възможността за съчетано лечение LT_3+LT_4 или с извлек от щитовидна жлеза. В системен анализ от 2015 г. са разгледани 6 препоръки от Северна Америка, 3 от Южна Америка и 4 – от Европа (12). Всички те поставят левотироксина като единствена препоръчвана алтернатива. В препоръките на ЕТА се коментира и възможността за съчетано лечение, но по-скоро като експеримент или последен избор при пациенти, неповлияващи се в достатъчна степен от лечението с левотироксин (9, 12).

В наблюдателно проучване се сравняват 469 лекувани с левотироксин пациенти с 9512 здрави контроли и се установява, че заместителното лечение с левотироксин наистина се асоциира с 15% по-високи нива на свободен T_4 и 15% по-ниски на свободен T_3 , независимо от оптималното ТСХ (33). Това е една от възможните причини за нарастващото разочарование на пациентите от лечението на хипотиреоидизма (17). От друга страна, липсата на съществена положителна промяна в качеството на живот и свързаната с щитовидната жлеза симптоматика при провеждано лечение на субклиничен хипотиреоидизъм с левотироксин (18) е една от причините и за недостатъчно придържане на пациентите към терапията (20). Затова персистираща и интересът към други възможности за терапия.

Новите указания на британския институт NICE, например, не препоръчват рутинната употреба на лиотиронин (LT_3), но и не я изключват (30). Отделни поданализи са показали предпочитания на пациентите към лиотиронин, по-голямо намаление на телесното тегло, вероятно и в зависимост от генетичната предиспозиция (30). Другата линия на проучвания изследва приложението на левотироксин като мека капсула или течна форма (25-28). В определени подгрупи пациенти (геца, с придружаваща ахлорхидрия, прием на множество медикаменти, парентерално хранене или след бариатрична хирургия) новите

Таблица 7. Основни причини за продължаващите симптоми на фона на еутиреоидизъм (нормално ТСХ, подредени според анкетирания по реда на намаляващата им значимост).

Въпрос / Отговор	Категорично не съм съгласен	Не съм съгласен	Неутрален	Съгласен съм	Категорично съм съгласен
Неспособност на LT_4 да възстанови нормалната физиология	21 (17,5%)	47 (39,2%)	29 (24,2%)	18 (15,0%)	5 (4,1%)
Психосоциални фактори	3 (2,5%)	11 (9,2%)	8 (6,7%)	81 (67,5%)	17 (14,1%)
Съпътстващи заболявания	1 (0,8%)	5 (4,2%)	12 (10,0%)	91 (75,8%)	11 (9,2%)
Синдром на хронична умора	1 (0,8%)	7 (5,8%)	20 (16,7%)	86 (71,7%)	6 (5,0%)
Нереалистични очаквания от пациента	3 (2,5%)	14 (11,7%)	31 (25,8%)	68 (56,7%)	4 (3,3%)
Подлежащо възпаление вследствие аутоимунния процес	3 (2,5%)	21 (17,5%)	38 (31,7%)	52 (43,3%)	6 (5,0%)
Тежестта на хроничните заболявания	0	2 (1,7%)	16 (13,3%)	93 (77,5%)	9 (7,5%)
Тежестта на нуждата от прием на лекарства	3 (2,5%)	15 (12,5%)	53 (44,2%)	45 (37,5%)	4 (3,3%)

форми и особено течната показват обещаващи предимства (25, 26). Тези форми имат известно положително влияние върху качеството на живот и оплакванията на пациентите с персистираща симптоматика на фона на обичайното лечение с таблетки LT_4 (27,28). Отделни проучвания доказват подобрен контрол на ТСХ (34) и по-голямо придържане на пациентите към терапията с новите фармацевтични форми на левотироксин (35).

Всички тези обстоятелства са причина и за доста разлики в поведението на самите лекари при изписване на лечение с левотироксин. Броят на анкетирания в нашето проучване бе сравнително ограничен и не позволяваше сравнение на поведението на специалистите ендокринолози с това на представителите на други специалности. Доказани са големи вариации в поведението на общпрактикуващите лекари в различните европейски страни (13). Характеристиките на пациентите влияят също значимо върху избора на терапия от страна на лекаря (32).

Резултатите от нашето проучване биха могли да се разглеждат в светлината на публикуваните данни от две големи италиански проучвания. Първото от тях оценява придържането към методичните указания за лечение с левотиро-

ксин (22). Включени са били над 1000 пациенти, като спазване на американските (на ААСЕ/АТА) и европейските тиреоидни указания (ЕТА) е регистрирано в 77,1% и 71,7% от пациентите, а ако се изключи въпросът за дозировката на левотироксина – в 86,7% и 88,6% от случаите (22). Второто проучване изследва поведението на ендокринолозите при еутиреоидни и хипотиреоидни пациенти и по-специално – изписването и избора на фармацевтична форма на тиреоидните хормони (21). В него са участвали 39,3% от всички италиански ендокринолози и 98,7% са посочили LT_4 като първи избор за лечение на хипотиреоидизъм. 43,2% обаче биха предложили комбинирано лечение ($LT_4 + LT_3$) на пациенти с нормално ТСХ, но с персистираща симптоматика. При едновременен прием на множество медикаменти 81,8% от ендокринолозите са посочили течната форма, тя е предпочитана и при лош биохимичен контрол на хипотиреоидизма или лош комплайънс към лечението (21).

И най-сетне, трябва да се има предвид, че различните лекари прилагат различни стратегии за откриване и следене на хипотиреоидизма (16), като проследяването на ТСХ също се осъществява на различни периоди от време (36, 37). Смята се, че използването на различни от таблетните

Таблица 8. Подгреждане на най-вероятните причини за персистиращите симптоми, например умора, на пациентите с постигнато нормално ТСХ (отговор 1 указва най-голяма вероятност).

Причини според лекарите*	Подгрежба по реда на намаляващата значимост, брой (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Тежестта на нуждата от прием на лекарства	9 (7,6%)	12 (10,1%)	4 (3,4%)	12 (10,1%)	7 (5,9%)	17 (14,3%)	24 (20,2%)	34 (28,6%)
Нереалистични очаквания	10 (8,4%)	9 (7,6%)	18 (15,1%)	17 (14,3%)	16 (13,4%)	19 (16,0%)	21 (17,6%)	9 (7,6%)
Неспособност на LТ ₄ да възстанови нормалната физиология	17 (14,3%)	9 (7,6%)	6 (5,0%)	7 (5,9%)	10 (8,4%)	7 (5,9%)	16 (13,4%)	47 (39,5%)
Психосоциални фактори	12 (10,1%)	19 (16,0%)	19 (16,0%)	21 (17,6%)	22 (18,5%)	10 (8,4%)	4 (3,4%)	12 (10,1%)
Подлежащо възпаление вследствие аутоимунния процес	14 (11,8%)	13 (10,9%)	10 (8,4%)	27 (22,7%)	18 (15,1%)	19 (16,0%)	11 (9,2%)	7 (5,9%)
Съпътстващи заболявания	17 (14,3%)	42 (35,3%)	13 (10,9%)	12 (10,1%)	15 (12,6%)	7 (5,9%)	10 (8,4%)	3 (2,5%)
Синдром на хронична умора	13 (10,9%)	24 (20,2%)	19 (16,0%)	23 (19,3%)	13 (10,9%)	8 (6,7%)	15 (12,6%)	4 (3,4%)
Тежестта на хроничните заболявания	23 (19,3%)	29 (24,4%)	22 (18,5%)	9 (7,6%)	20 (16,8%)	8 (6,7%)	5 (4,2%)	3 (2,5%)

* 119 валидни отговора

форми на левотироксин би спомогнало за оптимално решение на тези проблеми (38,39).

Важен фрагмент от нашето проучване е и частта, която касае поведението на лекарите с хипотиреозидизъм по отношение на собственото им лечение. Отново се вижда, че независимо от Указанията за добра клинична практика в съображение влизат и комбинирани форми и дори сух екстракт. Може да се допусне, че една от основните причини е изпитваната умора /слабост (при около половината), която обаче всъщност едва ли се дължи на щитовидната жлеза.

Заклучение

Настоящото проучване е първото по рода си у нас. То показва, че указанията за добра клинична практика и реалната медицинска дейност се различават в немалка степен. Независимо от добрите резултати при лечението с левотироксин, в много от пациентите персistirат неспецифични оплаквания и неоптимално качество

на живот. Това става причина за приложение от страна на лекарите на нестандартни лечебни методи като комбинирана терапия или такава с изсушен извлек. Въвеждането на форми на левотироксин под формата на меки капсули с гел или течен разтвор биха могли да спомогнат за разрешаване на някои от персистиращите проблеми в заместителното лечение при хипотиреозидизъм.

Благодарности

Авторите биха желали да благодарят сърдечно на колегите, които взеха присърце настоящото анкетно проучване и отговориха изчерпателно на всички въпроси, както и на доц. М. Вуков за статистическата обработка на резултатите.

Use of Thyroid Hormones in Hypothyroid and Euthyroid Patients: a THESIS* Questionnaire Survey of Bulgarian Physicians

*THESIS: Treatment of Hypothyroidism in Europe by Specialists: an International Survey

Borissova, Anna-Maria I.¹, Boyanov, Mihail A.², Attanasio, Roberto³, Hegedüs, Laszlo⁴, Nagy, Endre⁵, Negro, Roberto⁶, Papini, Enrico⁷, Perros, Petros⁸

¹ Clinic of Endocrinology and Metabolism, University Hospital „Sofamed“, Medical faculty, Sofia University „Saint Kliment Ohridski“, Sofia, Bulgaria

² Clinic of Endocrinology and Metabolism, University Hospital „Alexandrovska“; Department of Internal Medicine, Medical University Sofia, Bulgaria

³ Endocrine Unit, Galeazzi Orthopedic Institute IRCCS, 20161 Milan, Italy

⁴ Department of Endocrinology and Metabolism, Odense University Hospital, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

⁵ Division of Endocrinology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

⁶ Division of Endocrinology, V. Fazzi Hospital, Lecce, Italy

⁷ Department of Endocrinology and Metabolism, Regina Apostolorum Hospital, Albano, Rome, Italy

⁸ Department of Endocrinology, Royal Victoria Infirmary, Newcastle upon Tyne, United Kingdom

Address for correspondence:

Prof. Boyanov, Mihail A.,
Clinic of Endocrinology and Metabolism,
University Hospital „Alexandrovska“ – Sofia
Department Internal Medicine, Faculty of Medicine, Medical University Sofia
Address: 1, G. Sofiyski str., Sofia 1431, Bulgaria
Fax: +3592 9230 779, e-mail: mihailboyanov@yahoo.com

Submitted: 06. 10. 2020

Revised: 16.11.2020

Accepted: 28. 11. 2020

Abstract

Aim: to describe the use of thyroid hormones in hypothyroid and euthyroid patients by Bulgarian physicians with a focus on the formulations of levothyroxine (LT₄).

Materials and Methods: This is a cross-sectional, questionnaire-based survey. 120 physicians participated (88 females /32 males); 62,4% aged over 50 years. 74% were specialists in endocrinology, the remaining – general practitioners, internal medicine specialists, and a few others. The original questionnaire from the THESIS survey was used in Bulgarian. Its first part contained 8 questions exploring the physicians' characteristics (sex, age, specialty, years in medical practice, and others). The second part contained 24 questions revealing the preferences in the treatment of hypothyroidism. The statistical analysis was performed on the IBM SPSS 19.0 for Windows statistical package.

Results: One third (33,3%) of the participating physicians would not recommend LT₄ to euthyroid patients. 96% of the respondents accepted and 100% prescribed LT₄ as first line replacement therapy in hypothyroidism. Very few respondents (10%) found a place for prescribing triiodothyronine (LT₃) or a combination of LT₃ + LT₄ (6%). The LT₄ tablets were the preferred formulation by more than half of the respondents, however one fifth would prescribe soft-gel capsules also, and one sixth – the liquid solution. 52,5% of the physicians would not administer iodine or selenium; 34,2% would recommend LT₄ + LT₃ for shorter periods in prolonged hypothyroidism; and 24,2% – in case of persisting hypothyroid symptoms despite a normal TSH. The persistent symptoms despite optimal hormonal control were attributed to comorbidities, psychosocial factors, the chronic fatigue syndrome and the unrealistic

patients' expectations. 16 respondents (13,3%) admitted to have hypothyroidism and 43,8% of them reported excessive tiredness/fatigue. 25% of them would try $LT_4 + LT_3$, or desiccated thyroid extract (25%).

Conclusion: LT_4 is the primary thyroid hormone used in our country. The LT_4+LT_3 treatment and desiccated thyroid might still find use in the practice of some physicians. This study highlighted the difference between the treatment guidelines and consensuses, and real life.

Key words: hypothyroidism, levothyroxine, clinical practice, questionnaire

Introduction

Hypothyroidism is one of the most common endocrine dysfunctions. Worldwide 2% to 6% of women are expected to develop hypothyroidism lifelong, with two thirds having subclinical hypothyroidism and a high number remaining undiagnosed (1). A database review in the United States of people aged 65 and older showed an increase in the prevalence of hypothyroidism from 5,62% in 2007 to 8,24% in 2015 (2). However 28,0% were not receiving hormonal replacement and 17,4% had their thyroid-stimulating hormone (TSH) outside the recommended range (2). A study involving 2402 randomly selected Bulgarian subjects (1347 females and 1055 males) in 2006 found 3,2% subclinical and 0,9% overt hypothyroidism, with 61,7% newly diagnosed cases (3). A subsequent Bulgarian epidemiological study including 2032 subjects in 2012 registered an even higher prevalence (4). Subclinical hypothyroidism was confirmed in 4,5% of the females and 2,0% of the males, respectively overt one – in 3,2% and 1,1% (4).

The case of iodine deficiency in Bulgaria was closed in 2005; the iodination of salt with KJO_3 having been introduced since 1994 (5). A national representative survey including 3939 schoolchildren aged 7-11 years (equal numbers of girls and boys) from eight previously endemic and two non-endemic areas found a median iodine excretion of 198 $\mu g/L$, with only 6,9% of the samples being below 100 $\mu g/L$ (6). A very recent cross-sectional, multicenter population-based study included 547 pregnant women (mean age 30 ± 5 years) from 10 regions of Bulgaria and reported a mean level of urinary iodine of $181,6\pm 94,0 \mu g/L$, with a median of 170 $\mu g/L$ (95% CI: 161-177) (7).

The treatment of hypothyroidism is extensively reviewed in a variety of Guidelines and Practice Recommendations including the 2019 Bulgarian Recommendations for Good Clinical Practice in Thyroid Diseases (1,8-11). The replacement treatment in hypothyroidism is based on Levothyroxine and the optimal TSH levels are well known (11,12). Despite all efforts to simplify and standardize that treatment, a number of questions remain topic of hot discussions.

One difficulty lies in the common practice of the medical specialists across the different countries, as well as those of the General Practitioners and specialists in

Endocrinology (2,13-15). In our country the majority of hypothyroid patients are still managed in secondary care mainly by endocrinologists. Almost all Bulgarian thyroid patients are using public healthcare services. The increasing use of Levothyroxine (LT_4) might be also partly due to lower treatment initiation thresholds used by the physicians even if pregnant and breastfeeding women are excluded from analysis (16).

On the other hand, the patient satisfaction with the levothyroxine treatment results is in constant drop despite good hormonal control (17,18). A recent British online survey of individuals with self-reported hypothyroidism found a high percentage of dissatisfaction with treatment – 77,6%; and overall QOL scores were low. It is of note that the patient satisfaction did not significantly correlate with the type of thyroid hormone treatment (19). A similar phenomenon could deteriorate the patients' compliance (20), which in turn makes it crucial to study the administration of thyroid hormones to hypo- and euthyroid patients (21,22).

Thirdly, different formulations of levothyroxine (generic, branded, tablets, soft-gel capsules or liquid solution) have been recently available in the European countries. The bioequivalence of those different formulations is being questioned (23,24), as well as the advantages of capsules or liquid preparations in specific clinical scenarios (25-28). A very recent study investigated possible benefits of those new formulations and came to the conclusion that the evidence in favor of using $L-T_4$ soft and $L-T_4$ liquid in clinical practice over LT_4 tablets was still rather weak (29). In spite of the published Recommendations and Guidelines for the treatment of hypothyroidism, the administration of triiodothyronine (LT_3) or desiccated thyroid extracts seems still being under consideration (30,31). The only available thyroid hormone formulations in Bulgaria are LT_4 tablets (manufactured by 2 international companies).

The selection of proper treatment modalities is highly influenced by the persisting symptoms and by some specific patients' characteristics, despite biochemical control of hypothyroidism (32). Till now the physicians' preferences in prescribing different levothyroxine formulations in the context of persisting patient's symptoms have not been extensively studied. An Italian questionnaire-based pilot study (22) preceded the start of a joint European project including 28 participating countries under the name of THESIS (Treatment of Hy-

pothyroidism in Europe by Specialists: an International Survey), supported by IBSA Institut Biochimique SA. The Bulgarian Society of Endocrinology was among the invited participants.

The **objective** of this study was to explore the use of thyroid hormones in hypothyroid and euthyroid patients by Bulgarian physicians with a special focus on the different levothyroxine formulations (LT_4).

Materials and methods

The questionnaire

This study reflected the Bulgarian participation in the aforementioned THESIS project. It is based on a questionnaire filled on a voluntary basis by physicians involved in the diagnosis and treatment of hypothyroidism. The THESIS questionnaire was translated and adapted in Bulgarian by a bilingual clinician. It consisted of two parts. The first one included 8 questions identifying the main characteristics of the respondents (sex, age, specialty, years in practice, memberships, type of medical practice and thyroid patients' turnover). The second specific part consisted of 24 questions covering the practices and preferences in the treatment of hypothyroidism in our country. Several questions allowed multiple choices, others a free text comment. Information was gathered on the indications for prescribing thyroid hormones to euthyroid patients, as well as on the preferred thyroid hormonal replacement (LT_4 - levothyroxine, LT_3 - triiodothyronine), desiccated thyroid or combination treatment $LT_4 + LT_3$. The perceptions for differences between tablets, soft-gel capsules and liquid solutions were clarified: variability in absorption, in case of self-reported intolerance to various foods or the possibility of gastro-intestinal diseases, inability of taking LT_4 fasted or unexplained poor biochemical control of hypothyroidism. The transition to other formulations was addressed, as well as the TSH-recheck schedule. One question focused on the administration of dietary supplements (e.g. iodine or selenium), another one - on the combination treatment. Four questions explored the scenario with good hormonal control though persisting symptoms; in two of the questions the answers had to be arranged by the respondent themselves according to the probability for correctness. Five questions explored the presence of hypothyroidism in the respondents, the type of treatment they were taking as well as the undesired effects.

Participants in the questionnaire

One-hundred twenty-six physicians were invited by phone or e-mail on a random basis, mainly among the 440 practicing members of the Bulgarian Society of Endocrinology. Those who agreed to participate received the questionnaire per e-mail. Six of the invited (4.76%) did not return the questionnaire and dropped out. Therefore, a total of 120 physicians (95,2%) filled

in the questionnaire and participated in the survey. The first questionnaire was sent by e-mail on July 7th, and the last filled out received on July 30th, 2020. No reminders were sent. Thus the data collection took 24 days and the answers were inserted in an EXCEL data sheet. The review by an expert statistician and the data clarifications took another week. The survey was closed on Aug 6th 2020 and had an overall duration of 30 days.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed by an expert statistician on the IBM SPSS 19.0 for Windows statistical package. It included descriptive and frequency analysis. Several questions allowed for more than one answer, therefore the sum of all answers (in percentages) exceeded 100%.

Results

Participants

One hundred twenty medical specialists (respondents) returned a completely filled questionnaire - 88 females (73,3%) and 32 males (26,7%). The age distribution of the respondents is shown in *Fig. 1*.

Women predominated, as well as physicians aged 50 and older and those with more than 20 years in medical practice. The years in medical practice of the respondents are shown in *Fig. 2*.

The remaining professional characteristics of the respondents are displayed in *Table 1*.

Forty four percent of the respondents had two specialties - internal medicine and endocrinology / metabolic diseases or other; thus the endocrinologists comprised 74,0% (89 of 120, with three of them being pediatric endocrinologists). The participating endocrinologists thus represented 20,2% of the practicing members of the Bulgarian Society for Endocrinology.

Table 1 shows also that the physicians were evenly distributed according to the type of their medical practice. The majority of the participants had a rich clinical experience in the treatment of thyroid diseases. Eleven participants (9,17%) were members of the European Thyroid Association, 88 (73,33%) - of the Bulgarian Society of Endocrinology.

Common practice in the treatment of hypothyroidism

Type of thyroid hormone

The preferences regarding the type of thyroid hormone used - LT_4 (levothyroxine), LT_3 (triiodothyronine), desiccated thyroid (thyreoidea siccata) or combination of $LT_4 + LT_3$, are shown in *Table 2*.

As shown in *Table 2*, most of the respondents accepted and prescribed levothyroxine as first line hor-

Figure 1.

The age distribution of the respondents is shown in percentages

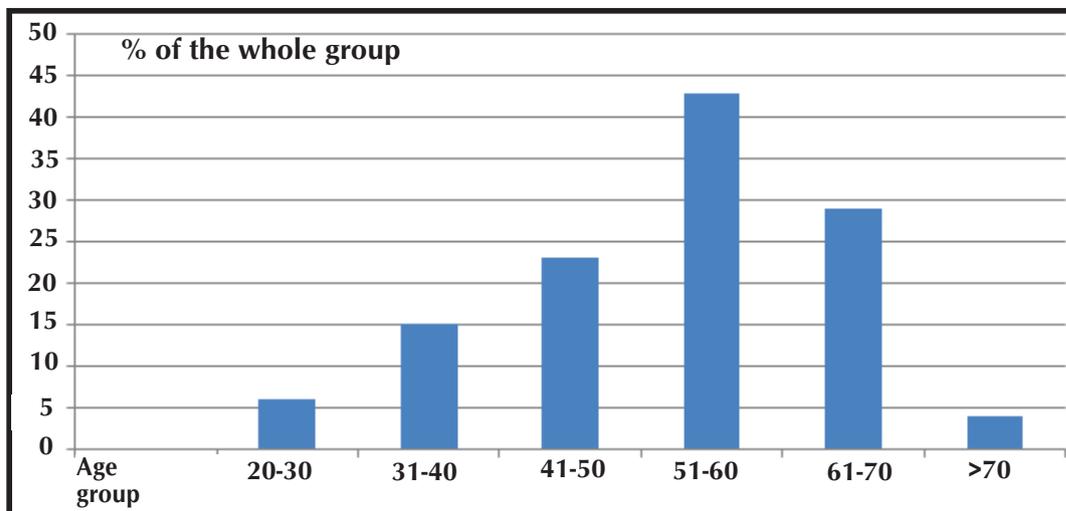
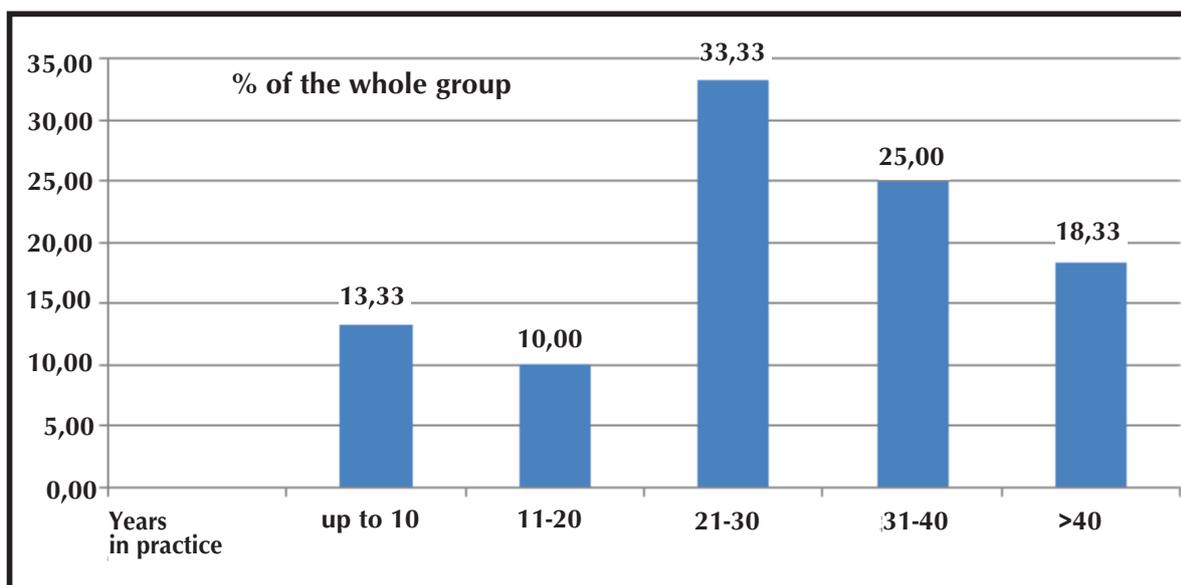


Figure 2. Years in medical practice of the respondents – the distribution is shown in percentages



monal replacement in hypothyroidism. Some of them, however, found a place for the use of triiodothyronine or a combination of $LT_4 + LT_3$. The desiccated thyroid has not been selected by anyone as a viable option.

Administration of thyroid hormones to euthyroid patients

The indications for for thyroid hormone treatment in euthyroid patients are summarized in Table 3 according to the respondents' answers. Several of them selected two or even more answers, therefore the sum of percentages exceeded 100%.

Preferences for the different formulations of Levothyroxine

Table 4 summarizes the preferences of the Bulgarian physicians concerning the administration of levothyroxine as a tablet, soft-gel capsule or liquid solution.

roxine as a tablet, soft-gel capsule or liquid solution.

The respondents expected the least variability of absorption of the different levothyroxine formulations as follows: tablets (n=68; 56,6%), soft-gel capsules (n=14; 11,7%), liquid solution (n=11; 9,2%). 27 respondents (22,5%) did not expect significant differences.

TSH check up

After the start of LT_4 replacement therapy 6 respondents (5%) would recheck TSH in two weeks, 76 (63,3%) – in 4-6 weeks, 38 (31,7%) – in 8 weeks. In case of a switch to a different formulation or change from one manufacturer's LT_4 tablet to another 63 physicians (52,5%) would check TSH in 4-6 weeks, 35 (29,2%) – in 8 weeks, 10 (8,3%) – according to clinical judgment, with 12 physicians (10,0%) doing no recheck.

Table 1.

Professional characteristics of the respondents (specialties, type of practice, turnover of thyroid patients)

Main characteristics	Possible answers	Number (%)
Specialisation	Endocrinology	86 (71,66)
	Internal medicine	68 (56,66%)
	Paediatric Endocrinology	3 (2,5%)
	General Medicine	17 (14,66%)
	Gynecology	1 (0,83%)
	Other	13 (10,83%)
Place of employment	University centre	29 (24,16%)
	Regional hospital	41 (34,16%)
	Private clinic	35 (29,16%)
	General Practice	1 (17,5%)
	Basic researcher	2 (1,66%)
Treats thyroid patients	Daily	73 (60,84%)
	Weekly	31 (25,83%)
	Rarely	16 (13,33%)
Number of patients with hypothyroidism treated	10-50/ year	27 (22,5%)
	51-100/ year	23 (19,17%)
	>100/ year	65 (54,17%)
	Rarely	5 (4,16%)

Table 2. The preferences regarding the type of thyroid hormone used – LT_4 (levothyroxine), LT_3 (triiodothyronine), desiccated thyroid (thyreoidea siccata) or combination of $LT_4 + LT_3$, are shown. The sum of percentages may exceed 100, as several respondents selected more than one possible answer.

Question	Possible answers	Number (%)
Which one should be first choice?	LT_4 (levothyroxine)	115 (95,84%)
	LT_3 (triiodothyronine)	1 (0,83%)
	Desiccated extract	1 (0,83%)
	Combination $LT_4 + LT_3$	3 (2,5%)
Which one is prescribed in practice?	LT_4 (levothyroxine)	120 (100%)
	LT_3 (triiodothyronine)	12 (10%)
	Desiccated extract	-
	Combination $LT_4 + LT_3$	7 (5,83%)

Dietary supplements (iodine, selenium)

Concerning the use of dietary supplements (selenium or iodide) a few respondents selected more than one answer. The majority of the respondents – 63 (52,5%) – would never use those supplements, but 18 physicians (15,0%) would administer them in autoimmune thyroiditis, 36 physicians (30,0%) – at the patient's request or as a complementary treatment and 7 physicians (5,8%) – in subclinical hypothyroidism.

Combination treatment $LT_4 + LT_3$

The possible indications for combined $T_4 + T_3$ treatment are listed in Table 5.

Persisting symptoms and patients' quality of life

The respondents' perceptions about persistence of

hypothyroid symptoms despite normal serum TSH are listed in Table 6.

The main reasons for persistent symptoms in most patients treated with levothyroxine who achieve normal serum TSH were listed in decreasing order of importance: psychosocial factors, the comorbidities, the inability of levothyroxine to restore normal physiology, chronic fatigue syndrome and the patient's unrealistic expectations (see Table 7).

Around 50% of the physicians did not think that the patient's fatigue might be attributed to the inability of levothyroxine to restore normal physiology; even more pointed out the burden of having to take chronic medications. When asked to rank the possible explana-

Table 3. The indications for thyroid hormone treatment in euthyroid patients are displayed as perceived by the respondents

Indications	Responses, n (%)
Unexplained fatigue	11 (9,2%)
Obesity resistant to life-style interventions	19 (15,8%)
Severe hypercholesterolemia, as a complementary treatment	17 (14,2%)
Depression resistant to anti-depressant medications	
Female infertility with high level of thyroid antibodies	21 (17,5%)
Simple goiter growing over time	66 (55,0%)
No, treatment is never indicated for these patients	40 (33,3%)

Table 4. The preferences of the Bulgarian physicians in the administration of levothyroxine as a tablet, soft-gel capsule or liquid solution are listed in different clinical scenarios. (A few respondents had selected more than one possible answer the question is then marked with an *)

Choice of levothyroxine formulation in different clinical scenarios	Possible choices	Responses, n (%)
1. A patient who self-reports intolerance to various foods raising the possibility of celiac disease, malabsorption, lactose intolerance, or intolerance to common excipients *	Tablets Soft-gel capsules Liquid solution No major changes with the different formulations	76 (63,3%) 20 (16,7%) 27 (22,5%) 16 (13,3%)
2. A patient established on generic T ₄ who has unexplained poor biochemical control of hypothyroidism*	Tablets Soft-gel capsules Liquid solution No major changes with the different formulations	59 (49,2%) 20 (16,7%) 18 (15,0%) 35 (29,2%)
3. A patient with poor biochemical control who is unable (due to busy lifestyle) to take LT ₄ fasted and separate from food / drink	Tablets Soft-gel capsules Liquid solution No major changes with the different formulations	50 (41,7%) 21 (17,5%) 19 (15,8%) 35 (29,2%)
4. A patient established on T ₄ who has good biochemical control of hypothyroidism but continues to have symptoms	Tablets from another manufacturer Soft-gel capsules Liquid solution No major changes with the different formulations	60 (50%) 8 (6,7%) 9 (7,5%) 43 (35,8%)

tion for persisting symptoms in patients achieving normal TSH under levothyroxine treatment using their own experience the physicians listed the most likely causes (Table 8).

Common practice in case of hypothyroidism in the physicians themselves

Sixteen of the participants (13,3%) reported to have diagnosed hypothyroidism, requiring thyroid hormone replacement. Seven of them (43,8%) experienced excessive tiredness/fatigue, 2 (12,5%) had tried

combined LT₃+LT₄ treatment and 2 (12,5%) had tried desiccated thyroid extract. Among those respondents without diagnosed hypothyroidism 15% indicated that they would administer combination treatment or desiccated extract to themselves.

Free comments regarding the combination treatment (LT₄+LT₃) or the desiccated extract

The most common comment was that levothyroxine is the best validated treatment option in hypothy-

Table 5. Possible indications for combined T₄+T₃ treatment. A few respondents selected more than 1 answer.

Possible indications	Responses, n (%)
For a short period, in patients recovering from protracted hypothyroidism	41 (34,2%)
In patients with normal serum TSH who still complain of symptoms suggestive of hypothyroidism	29 (24,2%)
In hypothyroid patients with normal serum TSH who complain of unexplained weight gain	8 (6,7%)
Due to the low quality of available evidence, combined therapy should never be used	48 (40%)

Table 6. The respondents' perceptions about persistence of hypothyroid symptoms despite normal serum TSH

Perceptions	Responses	Number (%)
Frequency of symptoms	<5%	50 (41,7%)
	6-10%	41 (34,2%)
	11-30%	8 (6,6%)
	More than 30%	3 (2,5%)
	Not sure	18 (15,0%)
Trends in this kind of cases	I am seeing more such cases	32 (26,6%)
	I am seeing fewer such cases	17 (14,2%)
	No change	42 (35,0%)
	Not sure	29 (24,2%)

roidism; that the experience with combined thyroid hormones was quite limited (also due to their unavailability on the Bulgarian market), and that treatment with desiccated extracts was quite out-of-date and not well standardized.

Multivariable analysis of answers based on the respondents' age, sex, type of medical specialty and type of practice

This type of analysis did not produce any significant differences in the physicians' answers due to the rather small numbers of participants in the different subgroups and the many coding variables in each category. However several tendencies were detectable.

The age and the years in practice of the respondents influenced their perceptions of the possible causes and etiology of persistent symptoms in patients treated with levothyroxine who achieve normal TSH (questions B16 and B17). The medical specialization affected the perceived indications for thyroid hormone treatment in biochemically euthyroid patients, the first choice for replacement treatment in hypothyroid patients, as well as the use of dietary supplements such as selenium and iodine (questions B1, B2, B12).

Discussion

The current study was the first of its kind among Bulgarian physicians and especially among endocrinologists. The results of the survey showed that levothyroxine is the main drug used to treat hypothyroidism. Despite their unavailability in our country, the combined forms of thyroid hormones and the dried extract could still find a place in the practice of some specialists. The main reasons for their use were perceived to be concomitant diseases, as well as the persisting symptoms despite optimal treatment with levothyroxine. Among respondents with personal history of hypothyroidism, almost one half reported weakness / fatigue, and 1/8- attempts to treat themselves with combination treatment or dried extract. Thus, the present survey showed the difference between guidelines for good clinical practice and real life.

In general, almost all guidelines rule out the combined treatment with LT₃ + LT₄ or with thyroid extract. In a comprehensive review from 2015, 6 recommendations from North America, 3 from South America and 4 from Europe were analyzed (12). They all had put levothyroxine as the only recommended option. The ETA recommendations commented on the possibility

Table 7. The main reasons for persistent symptoms in patients treated with levothyroxine who achieve euthyroidism were listed in decreasing order of importance

Etiology / Answer	Strongly disagree	Disagree	Neutral	Agree	Strongly agree
Inability of LT ₄ to restore normal physiology	21 (17,5%)	47 (39,2%)	29 (24,2%)	18 (15,0%)	5 (4,1%)
Psychosocial factors	3 (2,5%)	11 (9,2%)	8 (6,7%)	81 (67,5%)	17 (14,1%)
Comorbidities	1 (0,8%)	5 (4,2%)	12 (10,0%)	91 (75,8%)	11 (9,2%)
Chronic fatigue syndrome	1 (0,8%)	7 (5,8%)	20 (16,7%)	86 (71,7%)	6 (5,0%)
Unrealistic patient's expectations	3 (2,5%)	14 (11,7%)	31 (25,8%)	68 (56,7%)	4 (3,3%)
Underlying inflammation due to autoimmunity	3 (2,5%)	21 (17,5%)	38 (31,7%)	52 (43,3%)	6 (5,0%)
Burden of chronic disease	0	2 (1,7%)	16 (13,3%)	93 (77,5%)	9 (7,5%)
Burden of having to take medication	3 (2,5%)	15 (12,5%)	53 (44,2%)	45 (37,5%)	4 (3,3%)

of combination therapy also, but rather as short-term trial or last option in patients who do not respond sufficiently to levothyroxine treatment (9,12).

An observational study compared 469 levothyroxine-treated patients with 9,512 healthy controls and found that levothyroxine replacement therapy was indeed associated with 15% higher free T₄ levels and 15% lower free T₃ levels, regardless of optimal TSH (33). This tendency might be one of the possible reasons for the growing frustration of patients with the treatment of hypothyroidism (17). On the other hand, the lack of a significant positive change in quality of life and thyroid-related symptoms during treatment of subclinical hypothyroidism with levothyroxine (18) is one of the reasons for the insufficient adherence of patients to therapy (20). Therefore, the interest in other treatment options would still persist.

New guidelines from the British Institute of Clinical Excellence (NICE), for example, do not recommend the routine use of liothyronine (LT₃), nor do they rule it out (30). A few sub-analyses have shown patients' preference for liothyronine, as well as greater weight loss, possibly due to genetic predisposition (30). The other line of studies examined the use of levothyroxine as a soft capsule or liquid formulation (25-28). In certain subgroups of patients (children with concomitant achlorhydria, multiple medications, parenteral nutrition, or after bariatric surgery), the new formulations, and especially the liquid solution, showed promising benefits (25,26). These formulations have some positive effect on the quality of life and complaints of patients with persistent symptoms

during conventional treatment with LT₄ tablets (27,28). A few studies have shown improved TSH control (34) and greater patient adherence to therapy with the new pharmaceutical formulations of levothyroxine (35).

All these facts are the reason for many differences in the behavior of physicians when prescribing treatment with levothyroxine to them. The number of respondents in our survey was relatively limited and did not allow comparison of the practice of endocrinologists with that of other specialties. Large variations in the behavior of general practitioners in different European countries have been already demonstrated (13). The patient characteristics may also significantly influence the physician's choice of therapy (32).

Our results could be viewed in the light of published data from two large Italian studies. The first evaluated adherence to levothyroxine treatment guidelines (22). More than 1000 patients were included, and good compliance with the American (AAACE /ATA) and European thyroid guidelines (ETA) was registered in 77,1% and 71,7% of patients, and if the issue of optimal levothyroxine dosage excluded – in 86,7% and 88,6% of cases (22). The second study examined the practice of endocrinologists in euthyroid and hypothyroid patients, and in particular the selection and prescription of different thyroid hormone formulations (21). It involved 39,3% of all Italian endocrinologists and 98,7% of the participants indicated LT₄ as the first choice for the treatment of hypothyroidism. However, 43,2% would suggest combination therapy (LT₄ + LT₃) to patients with normal TSH but persistent symptoms. In case of concomitant use of mul-

Table 8. Ranked likely causes for persistent symptoms like fatigue in patients with normal TSH (1 is most likely).

Physician-perceived causes*	Ranking in order in order of importance, number (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
The burden of having to take medication	9 (7,6%)	12 (10,1%)	4 (3,4%)	12 (10,1%)	7 (5,9%)	17 (14,3%)	24 (20,2%)	34 (28,6%)
Patient unrealistic expectations	10 (8,4%)	9 (7,6%)	18 (15,1%)	17 (14,3%)	16 (13,4%)	19 (16,0%)	21 (17,6%)	9 (7,6%)
Inability of levothyroxine to restore normal physiology	17 (14,3%)	9 (7,6%)	6 (5,0%)	7 (5,9%)	10 (8,4%)	7 (5,9%)	16 (13,4%)	47 (39,5%)
Psychosocial factors	12 (10,1%)	19 (16,0%)	19 (16,0%)	21 (17,6%)	22 (18,5%)	10 (8,4%)	4 (3,4%)	12 (10,1%)
Presence of underlying inflammation due to autoimmunity	14 (11,8%)	13 (10,9%)	10 (8,4%)	27 (22,7%)	18 (15,1%)	19 (16,0%)	11 (9,2%)	7 (5,9%)
Comorbidities	17 (14,3%)	42 (35,3%)	13 (10,9%)	12 (10,1%)	15 (12,6%)	7 (5,9%)	10 (8,4%)	3 (2,5%)
Chronic fatigue syndrome	13 (10,9%)	24 (20,2%)	19 (16,0%)	23 (19,3%)	13 (10,9%)	8 (6,7%)	15 (12,6%)	4 (3,4%)
The burden of chronic disease	23 (19,3%)	29 (24,4%)	22 (18,5%)	9 (7,6%)	20 (16,8%)	8 (6,7%)	5 (4,2%)	3 (2,5%)

* 119 valid answers available

tiple drugs, 81,8% of the endocrinologists would select the liquid solution; which was also preferred in poor biochemical control of hypothyroidism or poor compliance with the treatment (21).

Finally, it should be born in mind that different physicians apply different strategies to detect and monitor hypothyroidism (16), and TSH monitoring is also performed at different time intervals (36,37). The use of different formulations of levothyroxine is expected to optimally address these problems (38,39).

An important part of our study concerns the behavior of physicians with hypothyroidism in relation to their own treatment. Again, notwithstanding the Guidelines for Good Clinical Practice, combined hormone preparations and even the desiccated extract could come into consideration. It seems that one of the main reasons is the experienced fatigue / weakness (in about half of the affected), which, however, could hardly be attributed to the thyroid gland.

Conclusion

This study is the first of its kind in Bulgaria. It showed that guidelines for good clinical practice and actual medical practice on fact differ considerably. Despite the good efficacy of levothyroxine treatment, many patients have persisting nonspecific complaints and suboptimal quality of life. This urges the physicians to use non-standard treatment methods such as combination therapy or desiccated thyroid extract. The administration of levothyroxine in the form of soft-gel capsules or liquid solution could help in solving some of the persistent problems in the replacement therapy for hypothyroidism.

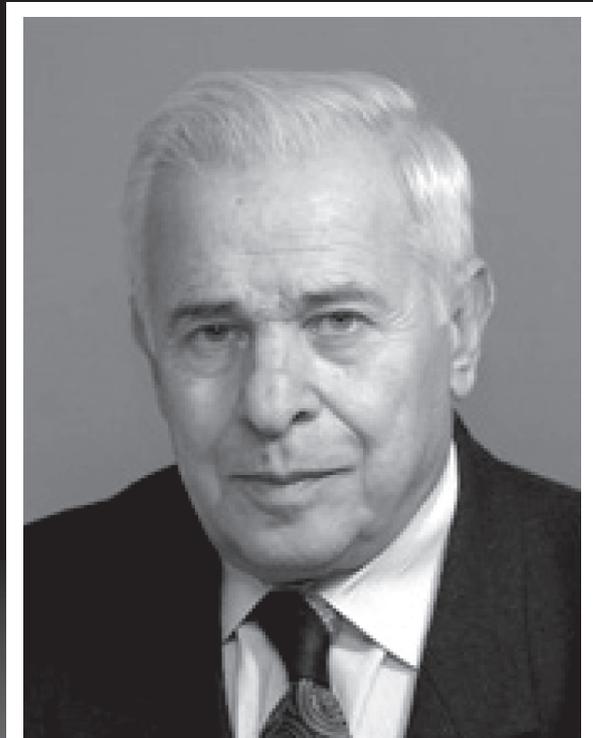
Acknowledgments

The authors would like to thank cordially all colleagues, who participated in the survey, as well as Assoc. Prof. M. Vukov for his expertise in biostatistics.

1. Garber JR, Cobin RH, Gharib H, Hennessey JV, Klein I, Mechanick JL, et al. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association [published correction appears in *Endocr Pract*. 2013 Jan-Feb;19(1):175]. *Endocr Pract* 2012; 18(6): 988-1028. doi:10.4158/EP12280.GL
2. Lage MJ, Espallat R, Vora J, Hepp Z. Hypothyroidism Treatment Among Older Adults: Evidence from a Claims Database. *Adv Ther* 2020; 37(5): 2275-2287. doi:10.1007/s12325-020-01296-z
3. Shinkov A, Borissova A-M, Kovatcheva R, Vlahov J, Dakovska L, Atanasova I, et al. Thyroid dysfunction and cardiovascular risk factors in Bulgarian adults. *Open Med (Poland)* 2013; 8(6): 742-748. doi: 10.2478/s11536-013-0235-9.
4. Shinkov A, Borissova A-M, Vlahov J, Dakovska L, Blajeva E. Male gender differences in the thyroid ultrasound features, thyroid peroxidase antibodies and thyroid hormone levels: a large population-based study. *J Endocrinol Invest* 2014; 37(3): 269-76. doi: 10.1007/s40618-013-0024-y.
5. Ivanova L. Monitoring and control of iodine deficiency in Bulgaria. *Monograph, Koti EOOD, Sofia 2016*, ISBN 978-619-90419-3-2 (in Bulgarian). [Иванова Л. Мониторинг и контрол на йодния дефицит в България. Монография, Коти ЕООД, София 2016, ISBN 978-619-90419-3-2].
6. Lozanov BS, Ivanova L, Timcheva Z, Vukov M. Eradication of iodine deficiency disorders in Bulgaria: results of the national representative survey on the iodine status and the endemic goiter – 2003. *Endocrinologia* 2004; 9(3):146-156 (in Bulgarian).[Лозанов БС, Иванова Л, Тимчева Ц, Вуков М. Ликвидиране на йоддефицитните заболявания в България: резултати от националното представително проучване на йодния статус и ендемичната гуша – 2003. *Ендокринология* 2004; 9(3):146-156].
7. Borissova A-M, Ivanova LB, Trifonova BC, Dakovska LN, Mihailova EN, Vukov MI. Urine iodine concentration, TPOAb, thyroid hormones in pregnant Bulgarian women – results of a screening study. *Endocrinologia* 2020; 25(3): 182-195. [Борисова, А-М, Иванова ЛБ, Трифонова БЦ, Даковска ЛН, Михайлова ЕН, Вуков МИ. Уринна йодна концентрация, ТРОАб, тиреоидни хормони при бременни българки – резултати от скринингово проучване. *Ендокринология*. 2020; 25(3): 182-195].
8. Jonklaas J, Bianco AC, Bauer AJ, Burman KD, Cappola AR, Celi FS, et al. Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement. *Thyroid* 2014; 24(12): 1670-1751. doi:10.1089/thy.2014.0028
9. Pearce SH, Brabant G, Duntas LH, Monzani F, Peeters RP, Razvi S, et al. 2013 ETA Guideline: Management of Subclinical Hypothyroidism. *Eur Thyroid J* 2013; 2(4): 215-228. doi:10.1159/000356507
10. Bekkering GE, Agoritsas T, Lytvyn L, Heen AF, Feller M, Moutzouri E, et al. Thyroid hormones treatment for subclinical hypothyroidism: a clinical practice guideline. *BMJ* 2019; 365:l2006. doi:10.1136/bmj.l2006
11. Bulgarian Society of Endocrinology. Recommendations for good clinical practice in diseases of the thyroid. 2019 (in Bulgarian). [Българско дружество по ендокринология. Препоръки за добра практика при заболявания на щитовидната жлеза. 2019].
12. Kraut E, Farahani P. A Systematic Review of Clinical Practice Guidelines' Recommendations on Levothyroxine Therapy Alone versus Combination Therapy (LT4 plus LT3) for Hypothyroidism. *Clin Invest Med* 2015; 38(6): E305-E313. doi:10.25011/cim.v38i6.26194
13. den Elzen WP, Lefèbre-van de Fliert AA, Virgini V, Mooijaart SP, Frey P, Kearney PM, et al. International variation in GP treatment strategies for subclinical hypothyroidism in older adults: a case-based survey. *Br J Gen Pract* 2015; 65(631): e121-e132. doi:10.3399/bjgp15X683569
14. Midgley JEM, Toft AD, Larisch R, Dietrich JW, Hermann R. Time for a reassessment of the treatment of hypothyroidism. *BMC Endocr Disord* 2019;19(1):37. doi:10.1186/s12902-019-0365-4
15. Guglielmi R, Frasoldati A, Zini M, Grimaldi F, Gharib H, Garber JR, et al. Italian Association of Clinical Endocrinologists Statement – Replacement Therapy for Primary Hypothyroidism – A brief guide for clinical practice. *Endocr Pract* 2016; 22(11): 1319-1326. doi:10.4158/EP161308.OR
16. Hennessey JV, Garber JR, Woeber KA, Cobin R, Klein I. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Position Statement on Thyroid Dysfunction Case Finding. *Endocr Pract* 2016; 22(2): 262-270. doi:10.4158/EP151038.PS
17. Peterson SJ, Cappola AR, Castro MR, Dayan CM, Farwell AP, et al. An Online Survey of Hypothyroid Patients Demonstrates Prominent Dissatisfaction. *Thyroid* 2018; 28(6): 707–721.
18. Feller M, Snel M, Moutzouri E, Bauer DC, Montmollin M, Aujesky D, et al. Association of Thyroid Hormone Therapy With Quality of Life and Thyroid-Related Symptoms in Patients With Subclinical Hypothyroidism: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 2018; 320(13): 1349-1359. doi:10.1001/jama.2018.13770
19. Mitchell AL, Hegedüs L, Žarković M, Hickey JL, Perros P. Patient satisfaction and quality of life in hypothyroidism: An online survey by the British Thyroid Foundation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2020 Sep 26. doi: 10.1111/cen.14340. Epub ahead of print. PMID: 32978985
20. Cappelli C, Castello R, Marini F, Paoletta A, Marchetti M, Saullo M, et al. Adherence to Levothyroxine Treatment Among Patients With Hypothyroidism: A Northeastern Italian Survey. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9:699. Published 2018 Nov 23. doi:10.3389/fendo.2018.00699
21. Vezzani S, Giannetta E, Altieri B, Barbonetti A, Belastella G, Certo R, et al. An Italian survey of compliance with major guidelines for L-thyroxine of primary hypothyroidism. *Endocr Pract* 2018; 24(5): 419-428. doi:10.4158/EP-2017-0159
22. Negro R, Attanasio R, Nagy EV, Papini E, Perros P, Hegedüs L. Use of Thyroid Hormones in Hypothyroid and Euthyroid Patients; the 2019 Italian Survey. *Eur Thyroid J* 2020; 9(1): 25-31. doi:10.1159/000502057
23. Bolton S. Bioequivalence studies for levothyroxine. *AAPS J* 2005;7(1):E47-E53. doi:10.1208/aapsj070106
24. Di Girolamo G, Keller GA, de Los Santos AR, Schere D, Gonzalez CD. Bioequivalence of two levothyroxine tablet formulations without and with mathematical adjustment for basal thyroxine levels in healthy Argentinian volunteers: a single-dose, randomized, open-label, crossover study. *Clin Ther* 2008; 30(11): 2015-2023. doi:10.1016/j.clinthera.2008.11.005

25. **Virili C, Trimboli P, Romanelli F, Centanni M.** Liquid and softgel levothyroxine use in clinical practice: state of the art. *Endocrine* 2016; 54(1):3-14. doi:10.1007/s12020-016-1035-1
26. **Formenti AM, Daffini L, Pirola I, Gandossi E, Cristiano A, Cappelli C.** Liquid levothyroxine and its potential use. *Hormones (Athens)* 2015; 14(2): 183-189. doi:10.14310/horm.2002.1579
27. **Guglielmi R, Grimaldi F, Negro R, Frasoldat A, Misichi I, Graziano F, et al.** Shift from Levothyroxine Tablets to Liquid Formulation at Breakfast Improves Quality of Life of Hypothyroid Patients. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2018; 18(3): 235-240. doi:10.2174/1871530318666180125155348
28. **Lombardi CP, Bocale R, Barini A, Barini A, D'Amore A, Boscherini M, et al.** Comparative study between the effects of replacement therapy with liquid and tablet formulations of levothyroxine on mood states, self-perceived psychological well-being and thyroid hormone profile in recently thyroidectomized patients. *Endocrine* 2017; 55(1): 51-59. doi:10.1007/s12020-016-1003-9
29. **Nagy EV, Perros P, Papini E, Katko M, Hegedüs L.** New formulations of Levothyroxine in the treatment of hypothyroidism: trick or treat? *Thyroid* 2020 Nov 2. doi: 10.1089/thy.2020.0515. Epub ahead of print. PMID: 33003978.
30. **Leese GP.** Nice guideline on thyroid disease: where does it take us with liothyronine?. *Thyroid Res* 2020; 13:7. doi:10.1186/s13044-020-00081-y.
31. **Hennessey JV.** Historical and current perspective in the use of thyroid extracts for the treatment of hypothyroidism. *Endocr Pract* 2015; 21(10): 1161-1170. doi:10.4158/EP14477.RA
32. **Jonklaas J, Tefera E, Shara N.** Physician Choice of Hypothyroidism Therapy: Influence of Patient Characteristics. *Thyroid* 2018; 28(11): 1416-1424. doi:10.1089/thy.2018.0325
33. **Peterson SJ, McAninch EA, Bianco AC.** Is a Normal TSH Synonymous With "Euthyroidism" in Levothyroxine Monotherapy? [published correction appears in *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(12): 4964-4973. doi:10.1210/jc.2016-2660
34. **Benvenega S.** Liquid and softgel capsules of l-thyroxine results lower serum thyrotropin levels more than tablet formulations in hypothyroid patients. *J Clin Transl Endocrinol* 2019;18:100204. doi:10.1016/j.jcte.2019.100204
35. **Scavone C, Sportiello L, Cimmaruta D, Sullo MG, Vitelli B, Rafaniell C, et al.** Medication adherence and the use of new pharmaceutical formulations: the case of levothyroxine. *Minerva Endocrinol* 2016; 41(2): 279-289.
36. **Razvi S, Hostalek U.** Therapeutic challenges in the application of serum thyroid stimulating hormone testing in the management of patients with hypothyroidism on replacement thyroid hormone therapy: a review. *Curr Med Res Opin* 2019; 35(7): 1215-1220. doi:10.1080/03007995.2019.1570769
37. **Ferrara R, Ientile V, Arcoraci V, Ferrajolo C, Piccinni C, Fontana A, et al.** Treatment pattern and frequency of serum TSH measurement in users of different levothyroxine formulations: a population-based study during the years 2009-2015. *Endocrine* 2017; 58(1): 143-152. doi:10.1007/s12020-017-1242-4
38. **Ernst FR, Sandulli W, Elmor R, Welstead J, Sterman AB, Lavan M.** Retrospective Study of Patients Switched from Tablet Formulations to a Gel Cap Formulation of Levothyroxine: Results of the CONTROL Switch Study. *Drugs R D* 2017; 17(1): 103-115. doi:10.1007/s40268-016-0150-z.
39. **Fallahi P, Ferrari SM, Ruffilli I, Ragusa F, Biricotti M, Materazzi G, et al.** Advancements in the treatment of hypothyroidism with L-T4 liquid formulation or soft gel capsule: an update. *Expert Opin Drug Deliv* 2017; 14(5): 647-655. doi:10.1080/17425247.2016.1227782

Професор
**Боян
Лозанов**
Professor
**Boyan
Lozanov**
1935-2020



Проф. Боян Лозанов беше изтъкнат ендокринолог, гоаиен на българската тиреоидология, дългогодишен ръководител на Катедрата по Ендокринология и на Клиниката по Тиреоидни и метаболитни костни заболявания в Университетската болница по Ендокринология „Акаг. Иван Пенчев“.

Повече от половината от над 60-годишния си трудов път като лекар и ендокринолог проф. Лозанов отдава на Университетската болница по Ендокринология – от ординатор до професор, той се труди всеотдайно за развитието на специалността и науката ендокринология. С пословичната си организираност и последователност, той се посвещава на развитието на тиреоидологията в отделно направление и оформянето на Клиника по тиреоидни и метаболитни костни заболявания. С неговия личен принос беше създаден Клиничният Център по Ендокринология и Геронтология (КЦЕГ), чийто ръководител е от 1993-2000 г., впоследствие прераснал в Катедра по Ендокринология към Медицински Университет София.

Проф. Лозанов е и главен редактор и съавтор на Ръководство по ендокринология, отпечатано в навечерието на 21 век и служило като настолна книга на поколения ендокринологи. През 10-годишния си мандат като научен секретар на Българското дружество по ендокринология, проф. Лозанов полага основите на списание „Ендокринология“ и като негов главен редактор в продължение на 18 години допринася за утвърждаването му като основна трибуна за популяризиране на научните постижения на българската ендокринология у нас и в чужбина. Като създател и ръководител на секция „Тиреоидея“ към Българското дружество по ендокринология, проф. Лозанов организира през 2002 г. Първия международен курс по тиреоидология за специалисти и лекари от Централна и Източна Европа, състоял се под егидата и с участието на водещи учени от Европейската Тиреоидна Асоциация. Със същия дух и ентузиазъм, през 2017 г. прие поканата да се включи в учредяването на Българско Сдружение Тиреоидея и Паратиреоидея, чиято единствена цел е да задълбочава познанието в тази област.

Дейността, която бележи голяма част от професионалния път на проф. Лозанов и се превръща в негова мисия, е борбата за създаване и приемане на Национална стратегия за превенция и ликвидирание на йод-дефицитните заболявания в България (Постановление № 96/1994). Изпълнението на поставените в нея цели и задачи през следващите 10 години води до официалното признаване на България от световните организации - ICCIDD и СЗО (2004), като страна без йоден дефицит.

Проф. Лозанов е не само истински лекар и учен, но и желан лектор, събеседник и учител на повечето от настоящите преподаватели и ръководители на структури в Университетската болница по Ендокринология „Акад. Иван Пенчев“ и Катедра по Ендокринология към Медицински Университет София. Той е носител и на най-високото съсловни отличие – почетен знак на Българския лекарски съюз – златен, за цялостни заслуги за развитие на медицинската наука и здравеопазването в България.

Поклон пред паметта му!

От името на Регколлегията – проф. д-р Русанка Ковачева,

*Ръководител на Клиника по Тиреоидни и метаболитни костни заболявания,
УСБАЛЕ „Акад. Ив. Пенчев“*

Prof. Boyan Lozanov was a prominent endocrinologist, a pioneer of thyroidology in Bulgaria and for many years head of the Department of Endocrinology and the Clinic of thyroid and metabolic bone disorders at the University Hospital of Endocrinology „Acad. Ivan Penchev“. Prof. Lozanov dedicated more than half of his 60 years in professional life to the University Hospital of Endocrinology and the specialty and science of endocrinology progressing from a clinical fellow to a full Professor. An organized and systematic person, he devoted much of his efforts to the development of thyroidology as an important field of endocrinology, as well as to the creation and recognition of the Clinic of Thyroid and Metabolic Bone Disorders.

He was the main contributor for the establishment of the Clinical Centre of Endocrinology and Gerontology, which he managed from 1993 to 2000 and which later evolved into the current Department of Endocrinology at the Medical University Sofia.

Prof. Lozanov was the editor and co-author of the Textbook of Endocrinology published on the eve of the 21st century that served as a key guide to endocrinology for several generations of Bulgarian physicians. In his ten years as scientific secretary of the Bulgarian Society of Endocrinology, he founded the journal Endocrinologia. Prof. Lozanov was the editor-in chief for the first 18 years of its existence with this being a period of advancement as the journal became the major platform for the publication of scientific achievements in the field of endocrinology.

Prof. Lozanov was the founder and head of the Thyroid section of the Bulgarian Society of Endocrinology. In 2002, he organised the First International Postgraduate Central and East Europe Course in Thyroidology. The course was held under the auspices of the European Thyroid Association and with the participation of prominent lecturers from the Association. With similar enthusiasm, he accepted the invitation to co-found the Bulgarian Thyroid and Parathyroid Society in 2017 with the sole purpose of promoting knowledge in that area.

Prof. Lozanov's most emblematic pursuit that became the mission of his career was the development and implementation of a National strategy for the prevention and elimination of iodine-deficient disorders in Bulgaria. Over a period of ten years starting in 1994, the stated goals were attained and the initiative culminated in the official certification of the country by the ICCIDD as a country without iodine deficiency.

Prof. Lozanov was not only a physician and a scientist but also a valued lecturer and mentor to most of the current academic staff of the University Hospital of Endocrinology „Acad. Ivan Penchev“ and the Department of Endocrinology at the Medical University Sofia. In January 2020, he was decorated with the highest award of the Bulgarian Medical Association for his overall contribution to the promotion of medical science and healthcare in Bulgaria.

We mourn his loss!

*On behalf of the Editorial Board – Prof. Roussanka Kovatcheva,
Head of Clinic of Thyroid and Metabolic Bone Disorders,
University Hospital of Endocrinology „Acad. Ivan Penchev“*

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. Оригиначните статии и казуси се отпечатват едновременно на български и английски език. По усмотрение на авторските колективи и преценка на редакционната колегия въз основа характера на материала, някои оригинални статии могат да бъдат публикувани само на български език. Материалите, предоставени от чужди автори, се поместват на английски език с цялостен или подбран превод на български език по преценка на редакционната колегия.

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

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

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

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

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

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

Титулна страница

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

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

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

Резюме

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

Основен текст

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

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

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

Title page

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

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

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

Abstract

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

Main text

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

Tables and figures

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

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

Таблицы и илюстрации

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

Книгопис

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

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

References

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

Examples

Reference to a journal article:

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

If the original cited paper is in Bulgarian:

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

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

Примери:

Статия от списание:

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

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

Глава (раздел) от книга:

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

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

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

References to a book chapter:

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

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

Address for sending the manuscripts and other editorial correspondence

Editorial Board Address for Correspondence:

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

Адрес на редакционната колегия:

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



ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

ENDOCRINOLOGIA

Списание
на Българското дружество
по ендокринология
към СНМД в България

Journal
of the Bulgarian Society
of Endocrinology (BSE)

Главен редактор

Проф. д-р Мария ОРБЕЦОВА, гм

Редактор на английския текст

Джеф ТОМАС

Отговорен редактор

Румен НИНОВ

© Първа корица и графичен дизайн

Румен НИНОВ

Editor-in-chief

Prof. Maria ORBETZOVA, MD PhD

English language editor

Jeff THOMAS

Art director Rumen NINOV

© *Cover&Design* Rumen NINOV

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

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

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

- SCOPUS Elsevier
Bibliographic Databases
(since 2001)
- EMBASE
- Bulgarian Citation Index
(since 1996)
- EBSCO (2019)

Адрес на редакционната колегия: Клиничен център –
УСБАЛЕ, „Акад. Иван Пенчев“ ул. „Здраве“ №2, 1431 София;
Мобилен: 0887771322 (проф. Орбецова), email: morbetzova@abv.bg,

Editorial Board: Clinical Center of Endocrinology „Acad. Iv. Penchev“ University
Hospital 2, Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;
Mobile (+359) 887771322 (Prof. Maria Orbetzova); email: morbetzova@abv.bg,