



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

Ендокринология

Endocrinologia

Българско дружество по ендокринология

- Адипоцитокини и туморигенеза
Adipocytokines and Tumorigenesis
- Съвременен поглед върху генетичната основа на патогенезата на синдрома на поликистозни яйчници (PCOS)
Contemporary View on the Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Pathogenesis
- Серумни нива на киспептин 10 и ендостатин при лица със затлъстяване и нарушения във въглехидратната обмяна
Serum Levels of Kisspeptin-10 and Endostatin in Patients with Obesity and Carbohydrate Disorders
- Хепатокини и тяхната връзка с основни метаболитни и съдови показатели при неалкохолна чернодробна стеатозна болест
Hepatokines and Their Relationship with Basic Metabolic and Vascular Parameters in Non-alcoholic Fatty Liver Disease
- Изследване на връзката между хиперандрогенизма при синдром на поликистозни яйчници и клинични данни за ранна гонартроза
Evaluation of the Relationship Between Hyperandrogenism in Polycystic Ovary Syndrome and Clinical Data for an Early Stage of Knee Osteoarthritis

3/2021

Bulgarian Society of Endocrinology



ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

Списанието се индексирва от/The journal is indexed by:

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

Editorial Board/Редакционна колегия и съвет

Editor-in-Chief: Maria ORBETZOVA

Главен редактор: Мария ОРБЕЦОВА

Анелия Томова/Aneliya Tomova

Анна-Мария Борисова/

Anna-Maria Borissova

Атанаска Еленкова/Atanaska Elenkova

Георги Кирилов/Georgi Kirilov

Живка Бонева /Zhivka Boneva

Здравко Каменов/Zdravko Kamenov

Иван Цинликов/Ivan Tzinlikov

Калинка Коприварова/Kalinka Koprivarova

Катя Тодорова/Katia Todorova

Кирил Христов/ Kiril Hristozov

Лидия Коева/Lidia Koeva

Малина Петкова/Malina Petkova

Митко Митков/Mitko Mitkov

Михаил Боянов/Mihail Boyanov

Нарцис Калева/Nartsis Kaleva

Пламен Попиванов/Plamen Popivanov

Радка Савова/Radka Savova

Русанка Ковачева/Roussanka Kovatcheva

Сабина Захариева/Sabina Zacharieva

Филип Куманов/Philip Kumanov

Цветалина Танкова/Tsvetalina Tankova

International Scientific Board/Международен научен съвет

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

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

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

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

A. Isidori (Rome)/А. Изигори (Рим)

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

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

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

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

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

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

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

Том XXVI / Volume XXVI

Съдържание**Обзори**

- **Василев, Георги В., Фейзулова, Айлин Г., Орбецова, Мария М.**
Адипоцитокени и туморигенеза 131

- **Димова, Иванка И., Фейзулова, Айлин Г., Василев, Георги В., Орбецова, Мария М.**
Съвременен поглед върху генетичната основа на патогенезата на синдрома на поликистозни яйчници (PCOS) 147

Оригинални статии

- **Недева, Ивета С., Гатева, Антоанета Т., Асьов, Явор С., Карамфилова, Вера Н., Великова, Цветелина В., Каменов, Здравко А.**
Серумни нива на киспептин 10 и ендостатин при лица със затлъстяване и нарушения във въглехидратната обмяна 164

- **Карамфилова, Вера Н., Асьов, Явор С., Недева, Ивета С., Гатева, Антоанета Т., Иванова, Ирена Д., Матева, Людмила В., Каменов, Здравко А.**
Хепатокени и тяхната връзка с основни метаболитни и съдови показатели при неалкохолна чернодробна стеатозна болест 175

- **Кабакчиева, Пламена П., Гатева, Антоанета Т., Георгиев, Цветослав А., Каменов, Здравко А.**
Изследване на връзката между хиперандрогенизма при синдром на поликистозни яйчници и клинични данни за ранна гонартроза 183

Journal **Endocrinologia** volume XXVI, number 3/2021

Contents**Reviews**

- **Vasilev, Georgi V., Feyzullova, Aylin G., Orbetzova, Maria M.**
Adipocytokines and Tumorigenesis 131

- **Dimova, Ivanka I., Feyzullova, Aylin G., Vasilev, Georgi V., Orbetzova, Maria M.**
Contemporary View on the Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Pathogenesis 147

Original articles

- **Nedeva, Iveta S., Gateva, Antoaneta T., Assyov, Yavor S., Karamfilova, Vera N., Velikova, Tsvetelina V., Kamenov, Zdravko A.**
Serum Levels of Kisspeptin-10 and Endostatin in Patients with Obesity and Carbohydrate Disorders 169

- **Karamfilova, Vera N., Assyov, Yavor S., Nedeva, Iveta S., Gateva, Antoaneta T., Ivanova, Irena D., Mateva, Ludmila V., Kamenov, Zdravko A.**
Hepatokines and Their Relationship with Basic Metabolic and Vascular Parameters in Non-alcoholic Fatty Liver Disease 178

- **Kabakchieva, Plamena P., Gateva, Antoaneta T., Georgiev, Tsvetoslav A., Kamenov, Zdravko A.**
Evaluation of the Relationship Between Hyperandrogenism in Polycystic Ovary Syndrome and Clinical Data for an Early Stage of Knee Osteoarthritis 191



Адипоцитокини и туморигенеза

Василев, Георги В.^{1*}, Фейзулова, Айлин Г.^{1* 2}, Орбецова, Мария М.³

¹ Медицински Факултет, Медицински Университет, Пловдив

² Медицински Факултет, Медицински Университет, София

³ Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, Катедра по Ендокринология, Медицински Факултет, МУ, Пловдив

* студент – Кръжок по Ендокринология, Катедра по Ендокринология, МФ, МУ, Пловдив

Постъпване: 30. 06. 2021/Ревизиране: 22. 08. 2021/Приемане: 30. 08. 2021

Adipocytokines and Tumorigenesis

Vasilev, Georgi V.^{1*}, Feyzullova, Aylin G.^{1* 2}, Orbetzova, Maria M.³

¹ Medical Faculty, Medical University, Plovdiv

² Medical Faculty, Medical University, Sofia

³ Clinic of Endocrinology and metabolic diseases, „Sv. Georgy“ University Hospital, Department of Endocrinology, Medical Faculty, MU, Plovdiv

* medical student – Department of Endocrinology, MF, MU, Plovdiv

Submitted: 30. 06. 2021/Revised: 22. 08. 2021/Accepted: 30. 08. 2021

Резюме

Затлъстяването е добре познат и утвърден рисков фактор за развитие на онкологични заболявания и се асоциира с по-агресивно протичане и лоша прогноза при някои типове карциноми, като точните механизми, обясняващи взаимовръзката между наднорменото тегло и туморигенезата са в процес на усилено изучаване.

Доказа се, че мастната тъкан не е пасивно депо на триглицериди и енергия, а мощен метаболитно-активен ендокринен орган, регулиращ редица физиологични и патологични процеси в човешкото тяло чрез своите секреторни продукти – адипоцитокини. При нормални условия мастната тъкан е обилно васкуларизирана и оксигенирана, но при изразена хиперплазия с хипертрофия на адипоцити в определени участъци възникват хипоксия и развитие на хронично нискостепенно възпаление, промяна в секрецията на адипоцитокини и стероидни хормони, нарушена регулация на растежните фактори, инфилтрация с клетки на имунния отговор и ремоделиране на екстрацелуларния матрикс и околните тъкани. Хипоксичната микросреда, в съчетание с ефектите на основни адипоцитокини, създават благоприятни условия за туморна клетъчна пролиферация, тъканна инвазия и неоангиогенеза. Все повече съвременни проучвания доказват, че някои от

Abstract

Obesity is a well known and established risk factor for the development of neoplastic diseases and is associated with a more aggressive disease course and worse prognosis in some carcinoma types. The exact mechanisms explaining the relationship between excessive weight and tumorigenesis are subjected to extensive research.

There is evidence that adipose tissue is not a passive triglyceride and energy depot, but a powerful metabolically active endocrine organ regulating a number of physiological and pathological processes in the human body through its secretory products – the adipocytokines. In normal conditions the adipose tissue is well vascularized and oxygenated whereas in marked adipocyte hyperplasia and hypertrophy a state of hypoxia and low-level inflammation takes place, a change of adipocytokine and steroid hormone secretion, a dysregulation of growth-factors, immune response cell infiltration as well as the remodelling of the extracellular matrix and peripheral tissues. The hypoxic micro-environment in conjunction with the effects of major adipocytokines create favourable conditions for tumor cell proliferation, tissue invasion and neoangiogenesis. A mounting body of evidence proves that some adipocytokines may significantly influence the growth and metastasizing

адипоцитокините могат да окажат значително влияние върху растежа и метастазирането на редица широко разпространени карциноми.

В обзора са разгледани теориите за връзката между дисфункционалната мастна тъкан при затлъстяване и развитието на малигнени процеси, както и някои данни от експериментални и клинични проучвания за влиянието на основни адипоцитокини и проинфламаторни фактори върху туморигенезата.

Ключови думи:

затлъстяване, мастна тъкан, адипоцитокини, туморигенеза, онкогенен риск

of numerous widely encountered carcinomas.

In the present review we discuss the theories about the relationships between dysfunctional adipose tissue in obesity and the development of malignant processes, as well as some data from experimental and clinical research on the influence of major adipocytokines and pro-inflammatory factors on tumorigenesis.

Key words:

obesity, adipose tissue, adipocytokines, tumorigenesis, oncogenic risk

Въведение

Характеристика на мастната тъкан

Мастната тъкан е специализирана рехава съединителна тъкан, изградена предимно от сгрупирани, богати на липиди клетки – *адипоцити*, заобиколени от екстрацелуларен колагенов матрикс, кръвоносни съдове, фибробласти и клетки на имунния отговор. Още от 90^{те} години на миналия век се установи, че мастната тъкан далеч не е само пасивно депо на триглицериди и енергия, а мощен метаболитно-активен ендокринен орган, способен да секретира множество хормони, растежни фактори, цитокини, компоненти на комплемента и свободни мастни киселини. Това се изясни, когато се докажа продуктът на об гена – протеин, изграден от 167 аминокиселини, по-късно наречен лептин, от гръцката дума *leptos* – слаб. Лептинът е първият идентифициран хормон на мастната тъкан от цяло множество впоследствие открити хуморални фактори, наречени със сборния термин – *адипоцитокини* (1, 2).

Въз основа на биологичните си функции мастната (адипозната) тъкан може да се класифицира в два основни типа: *бяла мастна тъкан* (WAT), локализирана подкожно, обграждаща висцерални органи или в млечните жлези при жени (млечна мастна тъкан – MAT) (2, 3) и *кафява мастна тъкан* (BAT) в парацервикалната, аксиларните и надключичните зони (4). Белите адипоцити са по-големи по размер, но имат по-малко митохондрии, в сравнение с кафявите, и се характеризират с еднинична (унилокуларна) мастна капка, съдържаща

триглицериди (заема над 90% от обема на клетката), за разлика от кафявите, които съхраняват триглицеридите в множество малки (мултилокуларни) липидни вакуоли (5). Изобилните митохондрии в BAT, които заедно с богатото ѝ кръвоснабдяване обуславят и кафявия ѝ цвят, експресират митохондриален декуплиращ протеин 1 (UCP1), участващ в топлинната регулация. Поради тези характеристики WAT е специализирана за съхранение на енергия и се явява ендокринният орган, участващ главно в контрола на телесното тегло, а BAT е основната тъкан, регулираща термогенезата в отговор на прием на храна и студ. BAT преобладава при новородени с оглед осигуряване на топлинната хомеостаза (5). Наскоро е описан нов тип адипоцити, наречени *бежови*. *Бежовите адипоцити* притежават някои общи черти с кафявите адипоцити, напр. експресия на UCP1, въпреки факта, че се откриват предимно в WAT, основно в подкожната компонента (6, 7). Бежовата мастна тъкан също е термогенна тъкан, подлежаща на регулация от сигнали, индуцирани от студ чрез симпатиковата нервна система. Описани са и някои „нетипични“ варианти на мастна тъкан като *тази*, намираща се в костния мозък. *Адипоцитите на костния мозък* (BM-Ad) притежават уникални свойства и се предполага, че функционират като бежови или кафявоподобни адипоцити (8, 9).

BAT заема само минимална част от тялото, която при възрастен индивид е приблизително 50 грама в сравнение с количеството на WAT, измерващо се в килограми. Именно WAT е истинският секреторен и метаболитно активен орган (10). Състои се от различни клетъчни типове, в

т.ч. зрели адипоцити, и пре-адипоцити, които съставляват само 14-24% от клетъчните популации, но поради големите си размери са нейният основен компонент (11). Пре-адипоцитите водят началото си от плурипотентни стволови клетки (по една на всеки 50 адипоцити) от мезодермален произход, чийто потенциал да генерират нови мастни клетки, когато са стимулирани и активирани, се запазва през целия човешки живот. Веднъж оформени, новите зрели бели адипоцити ще останат толкова до края на живота: те могат да се увеличават или намаляват по обем, но не и по брой (12).

Затлъстяване, мастна тъкан и онкологичен риск

В едно огромно ретроспективно наблюдателно проучване от края на миналия век в САЩ, включващо над 1 милион американци, категорично се доказва връзката между индекса на телесна маса (ИТМ) и смъртността – релативният риск за общата смъртност от всички причини нараства стръмно с покачване на ИТМ (13). Приблизително 40% до 60% от онкоболните са с наднормено тегло/затлъстяване (14), а за 2004 г. е оценено, че свръхтеглото е отговорно за 1 от 7 смъртни случая при мъжете и 1 от 5 при жените с малигнени заболявания в САЩ (15). Интересни са данните, че смъртността от онкологични заболявания расте праволинейно с по-високата телесна маса, за разлика от сърдечно- и мозъчно-съдовата смъртност, както и смъртността от пневмонии, които са повишават и в двата противоположни края на спектъра на ИТМ – кривата им има U-образен характер. Най-ниска смъртност вследствие малигнени процеси се регистрира при ИТМ от 23,5 kg/m² до 24,9 kg/m² при мъжете и 22,0 kg/m² до 23,4 kg/m² при жените (13).

Затлъстяването е добре познат и утвърден рисков фактор за множество онкологични заболявания, както и се асоциира и с по-агресивно протичане и лоша прогноза при някои хистологични типове. Днес се смята, че до 20% от онкологичната смъртност се свързва със затлъстяването (16, 17). Има достатъчно доказателства в подкрепа на връзката между затлъстяването и повишения риск от развитие на карциноми на дебелото черво и ректума, млечната жлеза в постменопаузалния период, ендометриума, бъбреците, хранопровода, черния дроб, жлъчния мехур, панкреаса и щитовидната жлеза, както и на неходжкинов лимфом и миелом (18-20).

Водещите хипотези, които се стремят да обяснят наблюдаваните връзки между затлъстяването и повишената заболяемост и смърт-

ност от рак, подчертават ролята на мастната тъкан като ендокринен орган и затлъстяването като потенциално състояние на мастна ендокринна дисфункция (21).

По принцип, телесните мазнини могат да се увеличат по два начина: чрез *хипертрофия* – увеличаване обема на адипоцитите и чрез *хиперплазия* – увеличаване на броя им. Адипоцитите могат да варират по размер (диаметър 20-200 μm): те могат да увеличат диаметъра си до 20 пъти, а обема – до няколко хиляди пъти. Хиперплазия на мастната тъкан възниква по време на определени физиологични периоди от живота (първата половина на бременността, първата година от живота и в началото на пубертета) или в специални ситуации, като затлъстяване. Във всички останали случаи настъпва хипертрофия (22).

Необходимо е да се подчертае, че хиперплазията, за разлика от хипертрофията, е необратим процес, така че дори в случай на редуция на тегло адипоцитите не намаляват по брой, а само по обем (23). Следователно е изключително важно да се предотврати прекомерното увеличаване обема на мастната тъкан, както и на броя на адипоцитите (хипертрофия+хиперплазия), особено при деца и погроставащи, при които това явление с голяма вероятност ги обрича да останат затлъстели за цял живот (24). Когато индивид със затлъстяване отслабва, мастните клетки губят определено количество мазнини, с което намалява обемът им, но броят им се запазва. Това е причината след спиране на много ниско калорийна диета при лица със затлъстяване първоначално редуцираните телесни мазнини до голяма степен да се възстановят за кратко време.

Хипоксия и ангиогенеза в мастната тъкан при затлъстяване

Прекомерното натрупване на триглицериди в белите адипоцити причинява прогресивно увеличаване на обема им и създава риск от нарушаване на техния интегритет. Тези клетки, обаче, нямат неограничен капацитет за нарастване и при достигане на определен размер предельно хипертрофираният адипоцит се уврежда от хипоксия и некротизира (25, 26). Въпреки че при нормални условия мастната тъкан е обилно васкуляризирана и оксигенирана, с настъпването на затлъстяване, придружено с хиперплазия и хипертрофия на адипоцитите, се регистрира значим спад в тъканното парциално налягане на кислорода (pO₂) – настъпва хипоперфузия на мастната тъкан, тъй като диаметъра на мастните клетки надхвърля дифузионния праг на кислорода (около 100 μm) и съдовата мрежа се оказва недостатъчна, за да

поддържа нормоксия в целия орган. Поради това определени участъци се оказват хипоксични и настъпва възпалителен отговор, който да повиши притока на кръв и да стимулира ангиогенезата.

Намаляването на локалната доставка на кислород до големите адипоцити води и до активиране на клетъчните пътища на оксидативен и механичен стрес, с развитие на органелна дисфункция, в частност на митохондриите и ендоплазматичния ретикулум (ЕР). Хипертрофичните хипоксични бели адипоцити се характеризират с промяна на извънклетъчния матрикс и колаген. Тяхната способност да се адаптират към това патологично състояние се състои в промяна на естествения протеинов синтез и пренасочването му към синтез на цитокини и други проинфламаторни сигнали, увреждащи клетъчната система на цялото тяло. Локално секретирани фактори привличат макрофаги в мастната тъкан, които формират подобна на корона структура около загиналите или загиващи адипоцити (Фиг. 1). Тъканните макрофаги от своя страна секретират цитокини, които по-нататък активират възпалителния процес в съседни адипоцити, засилвайки възпалението и метаболитните нарушения. В допълнение, прекомерната употреба на храна и затлъстяването често се съпътстват от повишаване на тъканните и циркулиращи концентрации на свободните мастни киселини (СМК), които могат директно да активират възпалителен отговор в съдово-ендотелните клетки, адипоцитите и клетките произлизащи от миелоидната тъкан.

В отговор на хипоксията може да настъпи и клетъчна адипоцитна смърт. Тежестта ѝ определя дали клетките ще загинат или ще се адаптират към хипоксията, като честотата на адипоцитната смърт корелира положително с размера на адипоцитите. Хипоксията инхибира също и адипоцитната диференциация и води до стрес на ендоплазматичния ретикулум в човешките адипоцити (27).

По този начин при затлъстяване хипоксията в мастната тъкан може да индуцира клетъчни механизми, които водят до развитие на инсулинова резистентност, хронично възпаление с инфилтрация на макрофаги, намаляване на секрецията на адипонектин и повишаване тази на лептин, загиване на адипоцити, стрес на ендоплазматичния ретикулум и митохондриална дисфункция (22, 26-29).

Тази трайно хипоксична микросреда, в съчетание със свръхсекретирани на някои цитокини обуславят благоприятни условия за туморна клетъчна пролиферация, тъканна инвазия и неопластогенеза (30). Така, по-нови проучвания показват, че при затлъстели животни е установено състояние на хипоксия на адипоцитите

и в условията на това хипоксично състояние взаимодействието между адипоцитите и стромалните съдови клетки допринася за развитие и прогресия на тумора (31).

При ниските стойности на pO_2 , както туморните клетки, така и тъканните макрофаги иницират про-ангиогенен сигнален път, посредством хипоксия-индуцируемия фактор-1 (HIF-1). HIF-1 представлява хетеродимерен протеин, транскрипционен фактор, състоящ се от две субединици – индуцируема α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) и конститутивно експресирана β (HIF-1 β). Хипоксията стабилизира и предпазва от разграждане HIF-1 α , като спира пост-транслационното ѝ хидроксилиране и протеазомна деградация. Допълнително, хипоксията стимулира свързването на HIF-1 α и HIF-1 β , както и техните кофактори (31, 32).

Идентифицирани са над 60 гени, чиято експресия се модулира от HIF-1. Част от тях са тези на васкуларно-ендотелния растежен фактор (VEGF), фибробластния растежен фактор (FGF)- β , IL-8 и гликолитичните ензими. Повечето от тях водят до стимулиране на неопластогенезата, глюкозния метаболизъм, клетъчната пролиферация, инвазията и метастазирването. Доказано е, че HIF-1 α се асоциира със стимулирано развитие на метастази.

Туморите често сами продуцират големи количества HIF-1, в резултат от бързия си неконтролируем и несъответен на кръвотока растеж, и възникването на интратуморна хипоксия. В допълнение, наличието на затлъстяване предразполага към още по-интензивен синтез на HIF-1 и разгръщане на малигнения туморен потенциал. Повишените нива на HIF-1 се асоциират с повишена смъртност и терапевтична резистентност при повечето познати злокачествени заболявания. В момента се извършват клинични проучвания на потенциални инхибитори на HIF-1 като част от противотуморната терапия (33), вкл. за повишаване чувствителността към лъчелечение (34).

Обобщено, ексцесивното натрупване на мастна тъкан се асоциира с развитие на хронично нискостепенно възпаление, промяна в секрецията на адипоцитокени и стероидни хормони, нарушена регулация на растежните фактори, предизвикана от метаболитни нарушения, инфилтрация с клетки на имунния отговор и ремоделиране на екстрацелуларния матрикс и околните тъкани (21, 26, 32) (Фиг.2). За някои естроген-зависими тумори значение има и повишеното производство на естрогени от мастната тъкан (26). Всички тези нарушения имат отношение към механизмите на карциногенеза, прогресия и метастазирване на малигнените процеси (35-37).

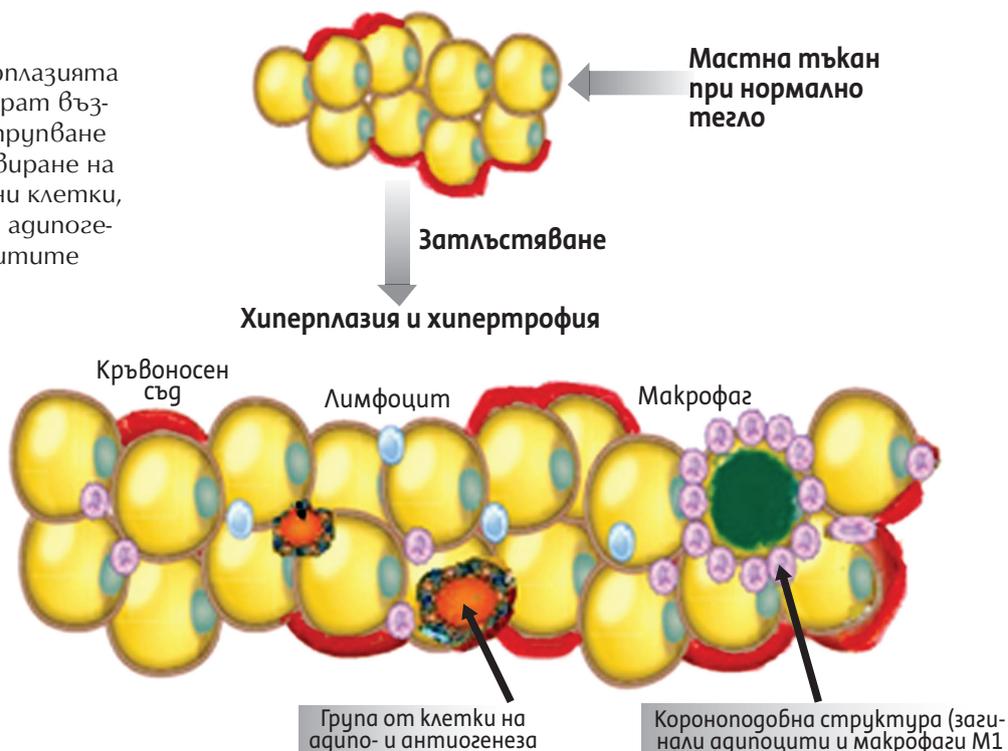
Хипертрофията, свързана с последваща хи-

поксиа, следователно е функционалният преход към генериране на „промяна“ на протеиновия синтез на адипоцитите в посока към повишено производство на локални и системни възпалителни агенти (38). Съществува тясна връзка между хипертрофичните бели адипоцити, секретират

ча макрофагите, инфилтриращи мастната тъкан. Експериментални данни сочат, че затлъстяването се асоциира със значително по-високи стойности на MCP-1, откъдето вероятно следва обилното присъствие и активация на макрофагите в мастната тъкан.

Фигура 1.

Хипертрофията и хиперплазията на адипоцитите индуцират възпалителна каскада и натрупване на имунни клетки, активиране на левкоцити, ендотелиални клетки, съчетани с ангиогенеза, адипогенеза и смърт на адипоцитите



възпалителни протеини, и функционалния статус на ендотела на капилярите, както и системните мазнини (39). Нещо повече, връзките между затлъстяването и възпалението, както и между хроничното възпаление и рака предполагат, че именно възпалението може да бъде свързващото звено между затлъстяването и възникването на малигнен процес (26, 36).

Макрофаги на адипозната тъкан и връзката им с туморните процеси

Макрофагите са представители на вродения имунитет и участват във фибро-васкуларната строма на мастната тъкан. Натрупват се все повече данни, че мастната тъкан при затлъстяване е обилно инфилтрирана от макрофаги, които участват в хроничен локален възпалителен процес и имат патогенен роля в ко-морбидните състояния на obesity.

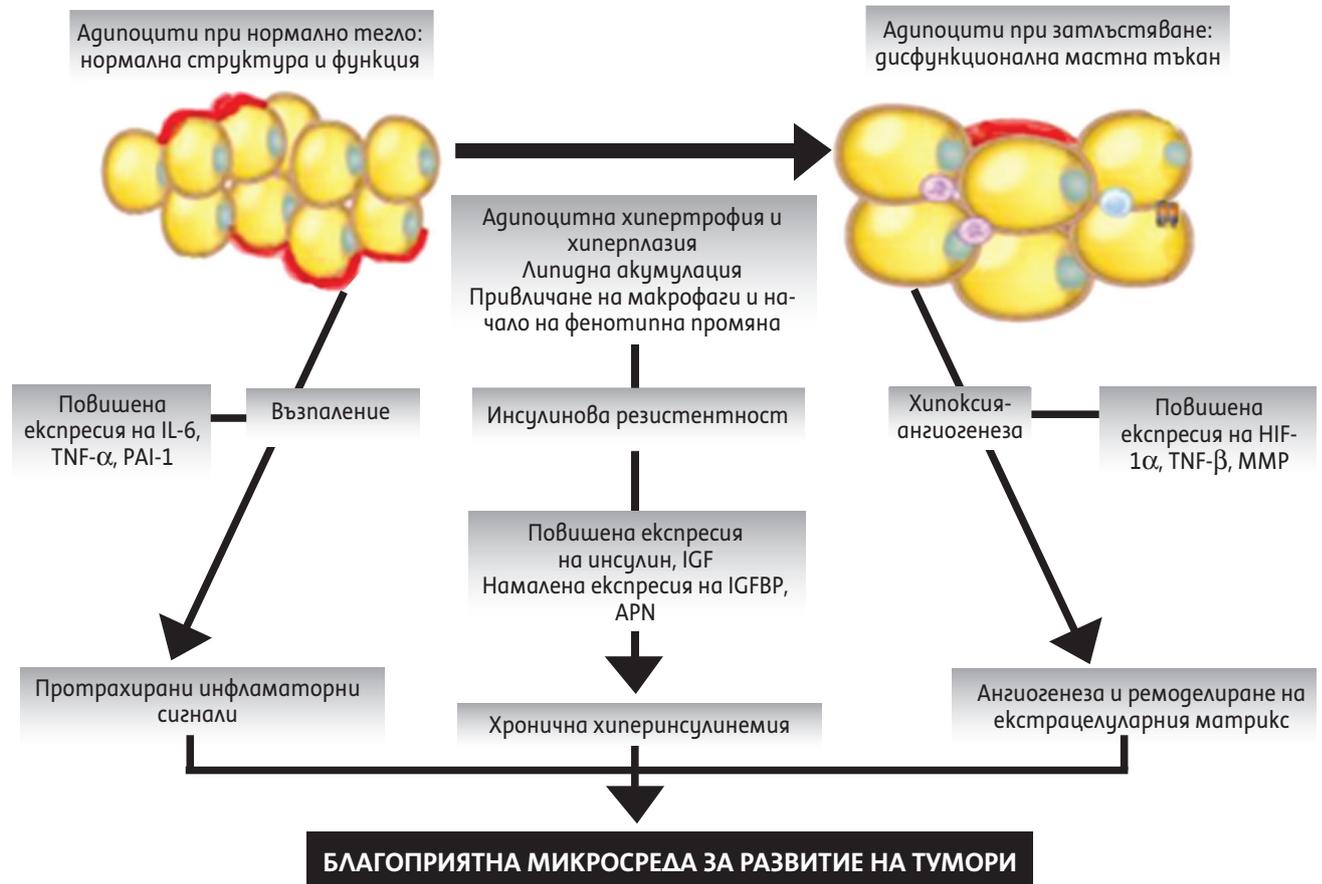
Моноцит-хемоатрактантния протеин-1 (MCP-1) е хемокин, на който се възлага ролята да привли-

Още повече, свърхекспресията на MCP-1 корелира с висок риск от развитието на овариален и колоректален карцином, наличието на метастази и лоша прогноза (32).

Фактори от тъканната среда могат да диференцират макрофагите в 2 категории: M1 макрофаги, които са „класическите“ про-инфламаторни и M2 – анти-инфламаторни. M1 макрофагите са първа линия на защита срещу интрацелуларни патогени и се стимулират от интерферон-гамма (IFN γ) и липополизахариди (LPS), а веднъж активирани, те секретират възпалителните цитокини TNF α , IL-1, IL-6. От друга страна, макрофагите под въздействие на IL-4 и IL-13, продуцирани от Th2 лимфоцити, се диференцират в M2 макрофаги, които секретират репаративни и имunosупресивни фактори – IL-10, IL-1Ra и аргиназа (Фиг. 2, Фиг. 3).

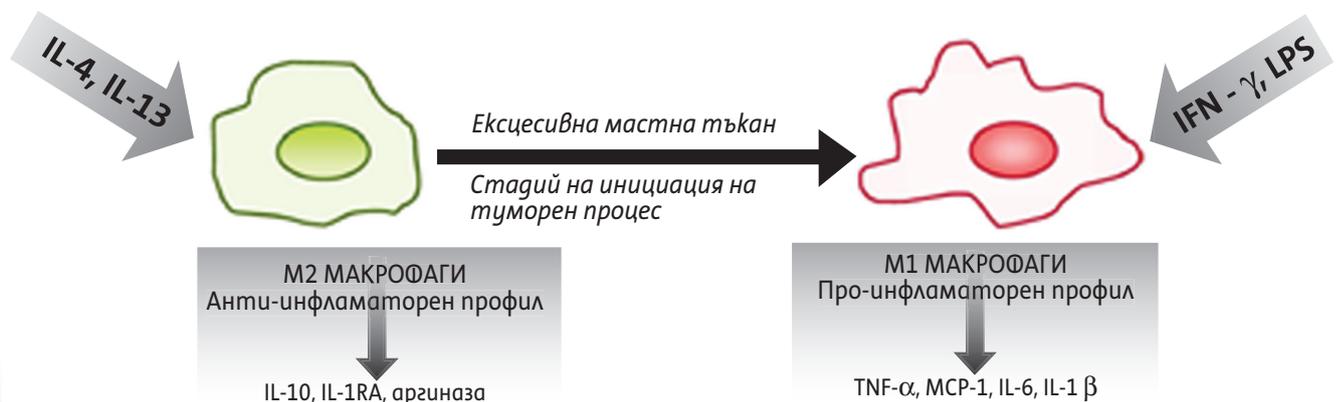
Подобно на мастната тъкан, туморната микросреда се състои от множество клетъчни типове, включително епителни клетки, фибро-

Фигура 2. Механизми, свързващи затлъстяването с развитието на малигненни процеси (адаптирано по 26).



APN – адипонектин; CRP- С-реактивен протеин; HIF-1- хипоксия-индуцируем фактор-1; IGF – инсулиноподобен растежен фактор; IGFBP – IGF свързващ протеин; IL- интерлевкин; MCP-1 – моноцит хемоатрактантен протеин; MMP – матриксни металопроотеинази; OPN - остепонтин; PAI-1 –инхибитор на плазминогеновия активатор-1; TGF-β – трансформиращ растежен фактор-β; TNF-α - тумор некротизиращ фактор-α; YKL-40 - хитиназа-3-подобен протеин

Фигура 3. Промяна в секрецията на макрофагите при затлъстяване (адаптирано по 32).



IFN-α - интерферон-γ; IL- интерлевкин; LPS – липополизахариди; MCP-1 – моноцит хемоатрактантен протеин; TNF-α - тумор некротизиращ фактор-α

бласти, мастоцити и клетки на вродената и придобитата имунна система, която благоприятства развитието на про-инфламаторна и про-туморигенна среда. Вирхов, преди повече от 100 години, подчертава връзката между хроничното възпаление и развитието на рак. Той установява увеличено наличие на левкоцити в неопластичната тъкан (38, 39). Оттогава ролята на хроничното възпаление се изучава при множество видове рак (40).

Установено е, че затлъстяването предизвиква промяна на имунния фенотип с ексцесивно преобладаване на M1 над M2 макрофагите, с последваща свръхсекреция на про-инфламаторни цитокини, поддържане на локалното възпаление и туморната експанзия. В късните стадии на онкологичните заболявания, вероятно като компенсаторен механизъм, е отбелязано обратен развоят на този имуен фенотип с преобладаване на M2 макрофагите, но все още не са изучени точните механизми и рецептори, чрез които настъпва тази трансформация (41).

Основни адипоцитокени и ролята им в развитието на някои карциноми

Лептин

Лептинът се секретира от адипоцитите в правопрпорционална зависимост от количеството мастна тъкан. Свързва се с LEPR – лептиновите рецептори, които имат 6 изоформи, кодирани от гена *db* и принадлежат към групата на цитокиновите рецептори. Въпреки че се срещат в много периферни тъкани и региони на ЦНС, основното им действие се осъществява в хипоталамуса. При нахранено състояние на индивида, лептинът, свързвайки се с неговия рецептор, стимулира експресията на проопиомеланокортина (POMC), кокаин/ амфетамин регулирания транскрипт (CART), както и потиска секрецията на невропептид Y/AgRP (агути свързан пептид), в крайна сметка усилващи секрецията на α -меланоцит-стимулиращия хормон (α MSH), понижаване на апетита, стимулиране на термогенезата и осигуряване на чувство на ситост. При гладуване, лептиновата концентрация намалява, проявяват се противоположни на описаните ефекти.

Освен действията си върху енергийната хомеостаза, лептинът предизвиква активация на Янус-киназа 2 (JAK2) – сигналния път, който фосфорилира интрацелуларни тирозинови радикали и по този начин стимулира съвкупност от вътреклетъчни каскади – сигналния трансдюсер и активатор на транскрипцията 3 (STAT3), митоген-активираната протеин киназа (MAPK) и

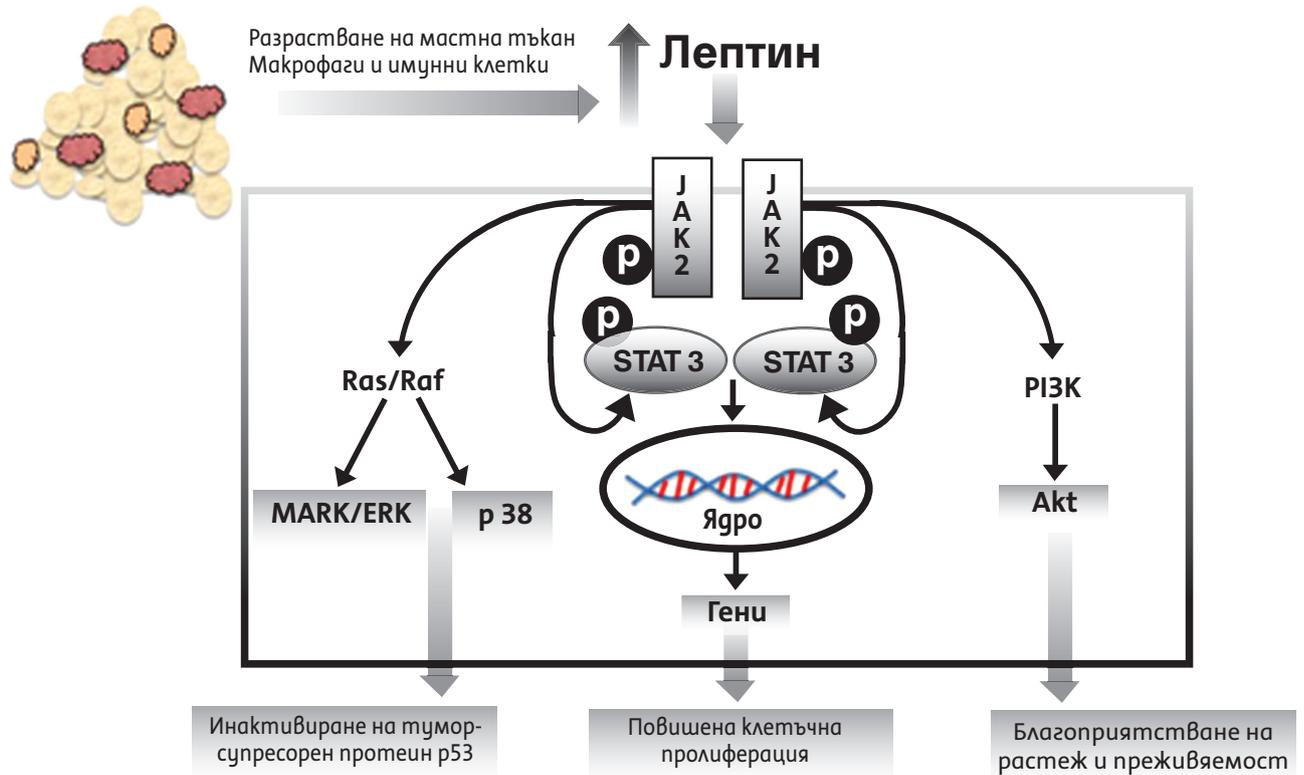
фосфатидилинозитол 3-киназния път, които регулират генната експресия, клетъчния растеж, диференциация и възпаление (42) (Фиг. 4)

Съществуват взаимни връзки между лептина и други хормони, напр. установено е, че инсулинът повишава лептиновата експресия, но при хиперинсулинемия се индуцира лептинова резистентност, чрез повлияване на JAK2 сигналния пост-рецепторен път. От друга страна, открити са лептинови рецептори в бета-клетъчния апарат на панкреаса, като се предполага съществуването на „адипоинсуларна“ отрицателна обратна връзка, посредством която хиперлептинемията потиска инсулиновата секреция (43).

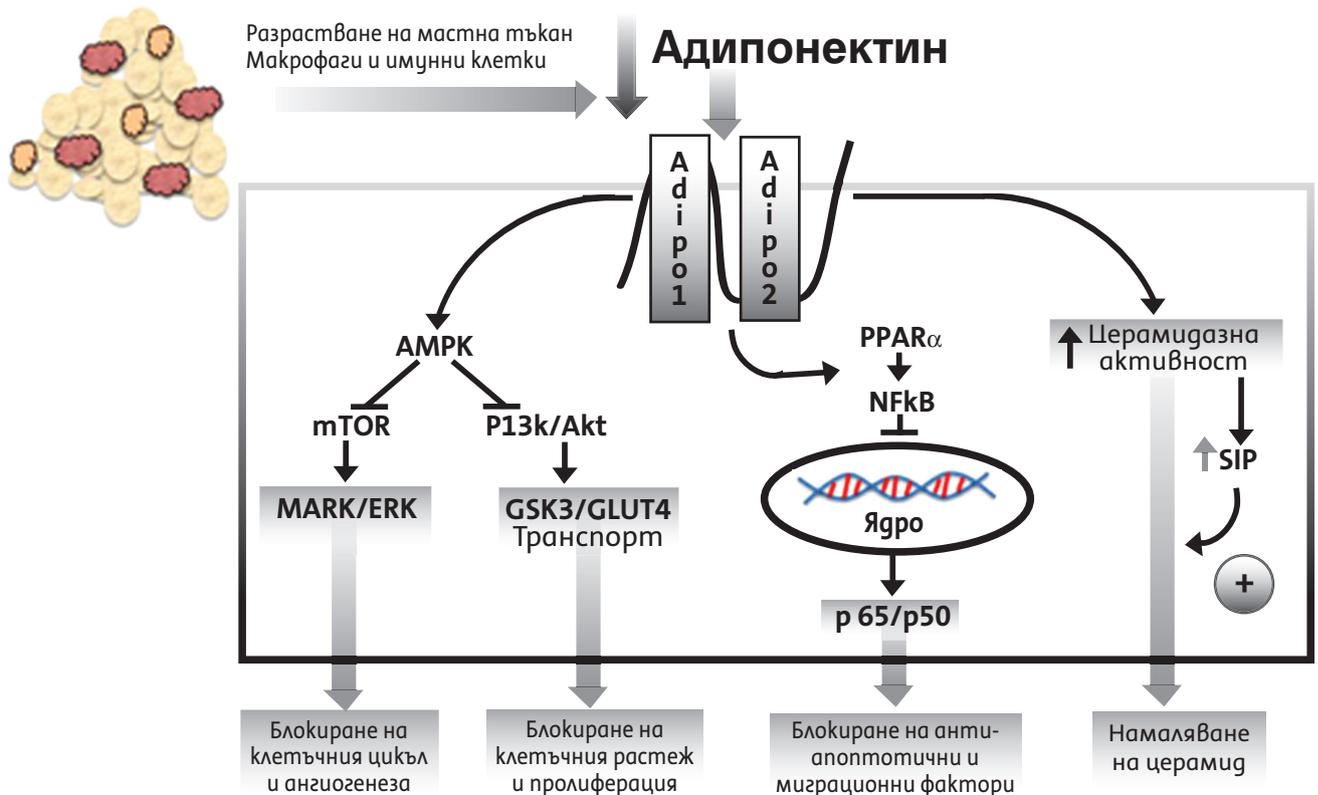
Лептиновата резистентност е един от ключовите патогенетични механизми на затлъстяването. Циркулиращите нива този основен адипоцитокен в серума при здрави контроли с нормално тегло са от порядъка на 5–15 ng/ml, докато при затлъстяване достигат 100 ng/ml и дори 250 ng/ml при най-тежките форми на obesity (42). Съществува определен транспортен праг за лептина през хематоенцефалната бариера (насища се при около 25 ng/ml), а затлъстяването се съпровожда с допълнително редуциране на този транспорт, поради което твърде високите серумни нива на лептина не успяват да потиснат ефективно апетита и да повишат термогенезата (2, 44). Има хипотеза, че лептиновата резистентност се е развила в хода на еволюцията, за да улесни натрупването на енергийни депа в ситуации на излишък от храна и да се избегнат неблагоприятните последици от гладуването при хранителен дефицит, който е бил много по-често срещан от прехранването в човешката история. При понижен енергиен прием, напр. гладуване за няколко дни, нивото на лептина спада драстично, непропорционално на пониженото количество мастна тъкан. Този негов спад води до запазване на енергийните резерви на организма, чрез понижаване на медуларната от тиреоидните хормони термогенеза, освен това се повишава и секрецията на глюкостероиди, които мобилизират енергийните депа и стимулират глюконеогенезата. Счита се, че при хората лептинът има предимно цел да запази хомеостазата на индивида в периоди на глад, но не е хормон, който ще предпази от ексцесивно натрупване на телесна маса във времена на прехранване и изобилие (44).

Зрелите адипоцити секретират както адипонектин, така и лептин, докато пре-адипоцитите секретират големи количества лептин (45). Така, увеличаването на пула на пре-адипоцитите при лица със затлъстяване е свързано с увеличаване и на лептиновите нива, с проангиогенни

Фигура 4. Ефекти на лептина при затлъстяване (адаптирано по 42).



Фигура 5. Ефекти на адипонектина при затлъстяване (адаптирано по 42).



и промитогенни свойства. Едновременно с това високите нива на лептин подпомагат функцията на възпалителните клетки, които стимулират диференциацията на моноцитите в макрофаги, благоприятстват по този начин развитието на obezitet-асоцираното хронично възпаление (46).

Епидемиологични проучвания откриват връзка между повишените циркулиращи лептинови нива и честотата на рака на гърдата и колоректалния карцином. Освен това, *in vitro* експерименти доказват пролиферативния ефект на лептина върху туморни клетки от гърда, простата, дебело черво, панкреас и яйчник (43, 47).

Дисрегулацията на контрола над клетъчния цикъл, поради свръхекспресия на CYCLIN D1 е един от основните патогенетични механизми за възникване на рака на гърдата, както и е маркер за лоша прогноза. D-тип циклините са активни през G1 фазата на клетъчния цикъл, те формират комплекси с циклин-зависимите кинази и катализират прехода от G1 към S фазата.

Експериментални данни показват, че лептинът индуцира свръхекспресия на CYCLIN D1 и така може да модулира контрола над клетъчния цикъл (47). За да се изясни молекулярният механизъм, по който лептинът стимулира туморната експанзия са изследвани сигналните каскади, които следват свързването му с лептиновия рецептор. Основният познат лептинов сигнален път се предава чрез JAK-STAT каскадата, като ключов се оказва STAT3 протеинът. Той действа като транскрипционен фактор, който в крайна сметка активира промоторния регион на CYCLIN D1 гена, с последващата му свръхекспресия и загуба на контрол върху клетъчния цикъл. Допълнителни проучвания с JAK/STAT инхибитори показват спиране на фосфорилирането на STAT3 протеина и потискане на лептин-индуцираната туморна пролиферация, като така се потвърждава ролята на този сигнален път и митогенния потенциал на лептина за рака на гърдата (48).

Онкогенният потенциал на лептина се потвърждава допълнително от дозо-зависимото му стимулиране на растежа на клетъчни култури с ER-позитивни клетки на карцином на гърдата. В *in vitro* експериментално проучване с T47D, MCF-7 и ZR75-1 туморни клетъчни линии, лептинът стимулира репликацията на ДНК, прогресията на клетъчния цикъл и растеж, паралелно чрез няколко сигнални пътища – JAK/STAT, регулирана от екстрацелуларни сигнали киназа (ERK) и протеин-киназа C (PKC) (43).

Друг механизъм, чрез който лептинът промотира растежа на естроген-зависимите тумори, като тези на гърдата и ендометриума, е чрез повишаване на ароматазната експресия и нейната активност, както в гранулоза клетките на

яйчниците, така и в мастната тъкан. Допълнително лептинът повишава броя и полуживота на естрогеновите рецептори (49). В експериментален модел с MCF-7 естроген-позитивен дуктален аденокарцином, приложението на лептин довежда до повишено клетъчно преживяване и растеж, посредством стимулация на Akt киназния път. Още повече, той довежда до преустановяване на ефекта на анти-естроген-рецепторния препарат фулвестрант, чрез пост-транслационна промяна на естрогеновия рецептор. Тези данни могат да обяснят защо при затлъстяване често се наблюдава развитие на резистентност към антиестрогени и ароматазни инхибитори (50).

В животински модел с мишки, които спонтанно развиват фоликуларен карцином на щитовидната жлеза (*ThrbPV/PVPten+/-*), едната група е хранена с висококалорийна, богата на мазнини диета, а контролната група – с нискомазнинна, нормокалорична диета. Хранените с висококалоричната храна развиват затлъстяване, имат ускорен туморен растеж и ниска преживяемост в сравнение с контролите. Установява се, че затлъстелите мишки имат повишено серумно ниво на лептин, cyclin D1 и фосфорилирания ретинобластомен протеин. Хистологично се доказва, че прехранените животни имат 2,6 пъти по-висок релативен риск от развитие на анапластичен карцином, отколкото контролите. Молекулярно-генетичен анализ доказва, че при затлъстелите животни е свръхактивиран JAK2-сигналният път – основен таргет на лептина, повишена е експресията на STAT3 протеина и промотираните от него онкогени. Тези данни потвърждават преходни хипотези относно канцерогенната роля на хиперлептинемията и предлагат възможности за бъдещи терапевтични интервенции, целящи повлияване на STAT3 сигналната трансдукция (51).

В проучване на Rehem и сътр. (52) преоперативните нива на лептин при пациенти с високодиференциран карцином на щитовидната жлеза (WDTC) са значимо по-високи в сравнение с контроли с бенигна ногозна струма [19,25 (1,50-109,60) ng/ml спрямо 0,90 (0,50-11,80) ng/ml, $p < 0,001$]. Един месец след оперативно лечение се наблюдава сигнификантно спадане на лептина при групата с WDTC – до 0,90 (0,60-8,90) ng/ml ($p < 0,001$), за разлика от контролната група – незначимо спадане до 0,80 (0,50-10,80) ng/ml, $p = 0,274$) (52). Авторите дори предлагат нивата на лептина да служат като диагностичен маркер при високо диференцирания тиреоиден карцином.

В обобщение, лептинът играе важна роля в развитието на редица малигнени процеси посредством потенциране експресията на анти-

апоптотични протеини, маркери на възпалението (TNF- α , IL-6), фактори на ангиогенезата (VEGF), както и на индуцирания от хипоксия фактор-1 α (HIF-1 α) [116,117]. Всички тези процеси способстват за увеличаване на преживяването, пролиферацията и миграцията на карциномните клетки (26, 42, 45)

Адипонектин

Адипонектинът е адипоцитокин с важна роля в глюкозния и липидния метаболизъм, който, за разлика от лептина, се секретира в обратнопропорционална зависимост от количеството мастна тъкан на индивида. Затлъстяването и захарният диабет тип 2 се асоциират както с понижена секреция на адипонектин, така и с понижена експресия на неговите рецептори – AdipoR1 и AdipoR2 (53).

Адипонектинът притежава анти-пролиферативен ефект, осъществяван чрез активирането на аенозин-монофосфат зависимата протеин киназа (AMPK) – ключов регулатор на пролиферацията в зависимост от хранителния статус на индивида. Освен това, адипонектинът е способен да потисне клетъчния цикъл и да индуцира апоптоза, чрез понижаване на фосфорилирането на mTOR и фосфатидилинозитол-3 киназния път (PI3K). Оказва „down” – регулация на лептин-индуцираната STAT3 фосфорилация, инхибиране на пътищата на NF- κ B и Wnt/ β -catenin и намалява продукцията на кислородни радикали (Фиг. 5). Напоследък има данни, че част от действията на адипонектина могат да се дължат на повлияването на сфинголипидната обмяна, чрез активиране на ензима церамидгаза, който разгражда активните церамиди до сфингозин-1-монофосфат (53). По този начин адипонектинът оказва противоположни на лептина въздействия върху туморния растеж.

Експресията на адипонектин се потиска от TNF- α и IL-6, а се стимулира от PPAR γ агонисти (54). Адипонектинът намалява пролиферацията на адипоцити, ендотелни и туморни клетки (55, 56). В допълнение към инхибирането на туморния растеж и преживяване, адипонектинът блокира ангиогенезата чрез намаляване експресията на VEGF и Vcl-2 (анти-апоптотичен фактор) и повишаване активността на p53, Вах и каспаза (про-апоптотичен фактор) с резултат апоптоза на ендотелни клетки. По същия начин, адипонектин доказано намалява TNF- α индуцираните ефекти върху клетъчните пролиферация и миграция (57, 58). Всъщност се открива, че намалените нива на адипонектин при затлъстяване са един от механизмите, които свързват затлъстяването с развитието и прогресията на рака

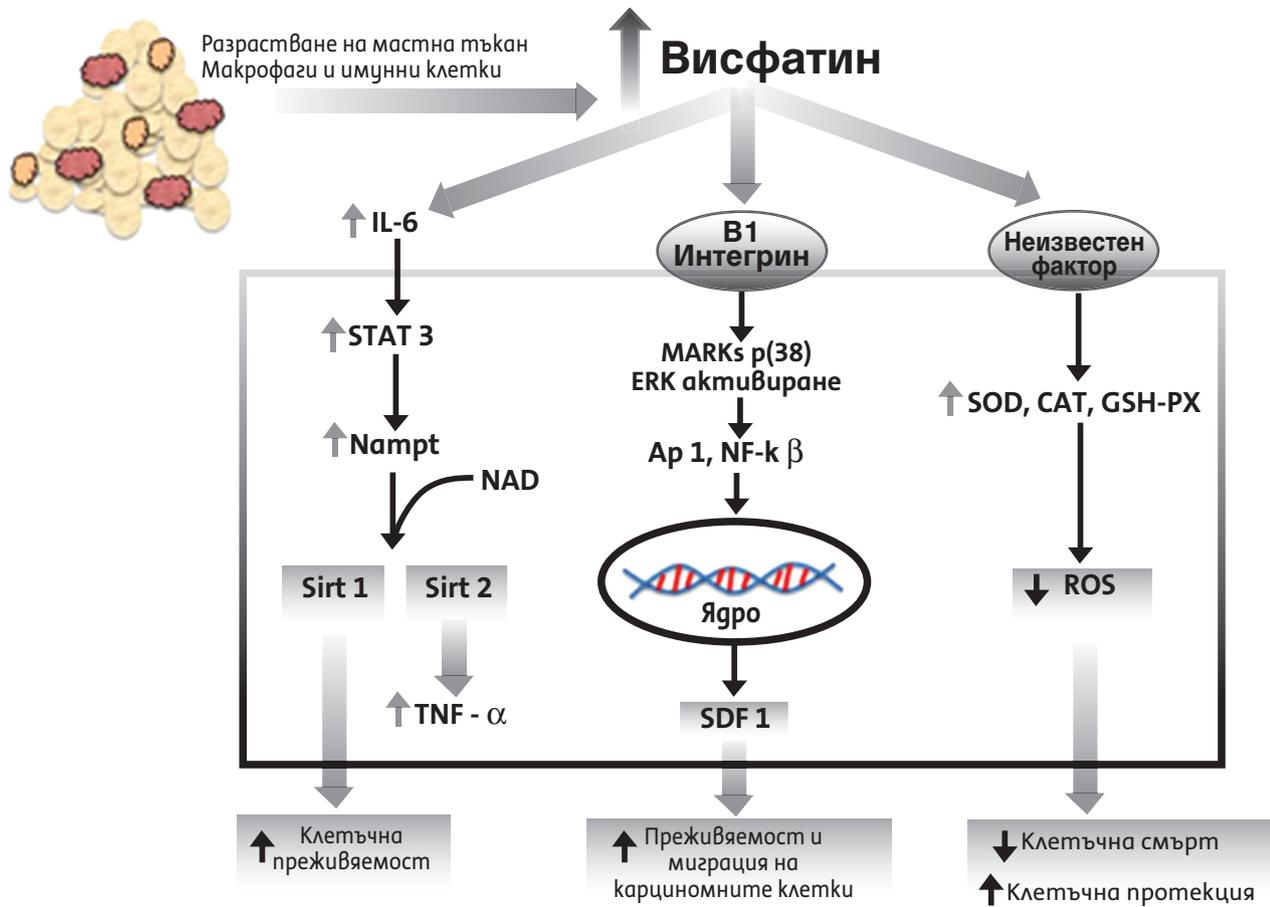
(59-62). Важно е, че нивата на адипонектин се откриват по-ниски при инсулинова резистентност и рак, асоциирани със затлъстяване (63). Инсулиновата резистентност се съпътства с компенсаторна хиперинсулинемия и повишаване нивата на бионаличен IGF1, което усилва туморната клетъчна пролиферация (64, 65). Ниските нива на адипонектин имат про-възпалителни ефекти посредством стимулиране производството на различни про-инфламаторни цитокини, включително TNF- α и IL-6, благоприятствайки по този начин развитието на пермисивна туморна микросреда, улесняваща туморното прорастване (66-68).

Различни експериментални модели потвърждават коренно противоположните роли, които притежават лептинът и адипонектинът по отношение на туморигенезата, подобно на ефектите им върху болестите на обмяната – при клетъчна култура с простатен карцином адипонектинът потиска туморния растеж, като ефектът се прекратява при добавяне на лептин, а при модели с хепатоцелуларен карцином лептинът увеличава туморната маса, до момента, в който се приложи адипонектин (69).

Епидемиологични проучвания показват обратна корелация между нивата на циркулиращия адипонектин и риска от развитие на някои видове карциноми – на гърдата при постменопаузални жени, както и ендометриален, колоректален и бъбречноклетъчен, панкреасен, чернодробен, простатен (70-72). В наблюдателно проучване от Турция, нивата на адипонектина корелират обратнопропорционално както с инсулиновата резистентност, така и със стадия и прогнозата на колоректалния карцином (73). Адипонектиновият дефицит способства туморния растеж (54, 74, 75).

От друга страна, за разлика от находката при затлъстяване, в редица човешки ракови тъкани се наблюдава повишена експресия на адипонектиновите рецептори (AdipoR1 и AdipoR2) (76-78). Чоу и сътр. (79) анализират връзката между експресията на AdipoR1 и AdipoR2 в редица човешки неоплазми и прогресията на малигнените процеси, оценена на основа локални (в лимфните възли) и далечни метастази. Установена е статистически значима връзка между експресията на AdipoR1 и рака на бъбреците - с и без метастази. В еволюцията на рака на бъбреците - неоплазма, силно асоциирана със затлъстяване, се наблюдават по-ниски нива на серумния адипонектин и значително по-изразена експресия на AdipoR1 рецепторите в туморната тъкан, в сравнение с неоплазми, не свързани със затлъстяване. При рак на гърдата високата експресия

Фигура 6. Ефекти на висфатина при затлъстяване (адаптирано по 42).



на AdipoR1 е свързана със съдова инвазия. За разлика от това, при стомашен карцином, повишената експресия на AdipoR1 се асоциира с по-голяма преживяемост (79).

Тъй като секрецията на адипонектина и на лептина е разнопосочно променена при затлъстяване, логично е съотношението лептин:адипонектин да се явява основен фактор, повлияващ туморния растеж. Клиничните проучвания показват положителна връзка между високото съотношение лептин:адипонектин и повишения риск от рак на гърдата в постменопаузалия период (80, 81), рак на ендометриума (82) и колоректален карцином (83). Интересно е, че карцином-свързаните адипоцити показват намалена експресия на адипонектин (84), което предполага отнемане на адипоцити от раковите клетки за стимулиране на туморния растеж.

Оментин

Парадоксално, затлъстяването се асоциира с понижен риск от развитие на рак на белия дроб, както и с по-добра преживяемост при вече диагно-

стициран такъв – факт, доказан от множество епидемиологични проучвания през последните десетилетия. Мета-анализ от м. януари 2021 г. потвърждава тези резултати, като ИТМ > 25 kg/m² устойчиво се асоциира с понижен релативен риск от белодробен карцином, независимо от хистологичния вид, пол и тютюнопушене. За да се обясни механизмът на тази интересна находка, е изследвана генната експресия на познатите ни адипоцитокени в туморите, туморната микро-среда и при здрави контроли. Единственият адипоцитокен със статистически значимо повишена експресия при здравите контроли се оказва оментинът, на който се възлага протективната роля на мастната тъкан по отношение на белодробния карцином. Освен това, повишената му експресия при пациенти с рак на белия дроб се асоциира със значително по-добра прогноза, в сравнение при пациенти с ниска експресия (HR=0,76, p = 0,00083).

Оментинът, още познат като интелектин – ITLN е новоткрит адипоцитокен, произвеждан предимно от висцералната мастна тъкан. Съществува под 2 изоформи – оментин 1 (ITLN1) и

оментин 2 (ITLN2). По отношение на останалите адипоцитокени, секрецията на оментин корелира правопрпорционално с тази на адипонектина, и обратнопрпорционално с тази на лептина (85). Оментинът в експериментални условия подобрява инсулино-медираната периферна глюкозна утилизация, чрез стимулиране на фосфорилирането на киназата Akt – ключов вътреклетъчен инсулинов посредник (86).

По отношение на гружи тумори, оментинът има разнопосочни въздействия – напр. установено е, че високите стойности на ITLN1 подобряват преживяемостта и снижават инвазивния и метастатичния потенциал на овариалните серозни кистаденокарциноми, чрез потискане експресията на матриксните металопротеинази (MMP) (87).

От друга страна, високи нива на оментин са доказани при болни с рак на простатата, в сравнение със здрави контроли. Още повече, оментините нива са корелирали позитивно със стойностите на PSA, което поставя хипотезата за ползване на оментин като потенциален биомаркер за простатния карцином (88).

При аденокарцином на панкреаса серумните нива на оментин също са значително завишени, в сравнение със здрави контроли, както и корелират с размера на първичния тумор и метастазите, но, за разлика от преходните разгледани тумори, тук липсва корелация с преживяемостта (89).

Висфатин

Висфатинът е адипоцитокен с инсулино-миметичен ефект. Участва в сигнални пътища между клетки на имунната система и има ензимна активност, регулирайки синтеза на НАД⁺. Като цитокин, той стимулира експресията на много гружи про-възпалителни медиатори като TNF α , IL-1 β , IL-6 и промотира диференциацията на В-лимфоцитите (90). (Фиг. 6).

Най-добре проучена е асоциацията на висфатина с колоректалния карцином, но се натрупват и данни относно връзката му с рака на гърдата. Предлагат се няколко възможни механизма, чрез които този адипоцитокен влияе върху карциногенезата – повишавайки синтеза на другите споменати про-инфламаторни цитокини по каскадата IL-6 – TNF- α и повишавайки преживяемостта и миграцията на туморните клетки, посредством ERK и MAPK сигналните пътища и стимулиране на произхождащия от стромалните клетки фактор-1 (SDF-1). Трети, интересен механизъм включва свръхпродукцията на редуциращи субстанции и стимулация на антиоксидантните ензими – супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GSH-Px), които обезвреждат реактивните кислородни радикали в (ROS). Последните, освен че имат потенциал на

патогенна функция, са и основно оръжие на имунната система срещу туморни клетки – висфатинът е способен да ги предпазва от цитотоксичното действие на ROS, предотвратява апоптозата и позволява тяхното преживяване и миграция (91).

Резистин

Резистинът, подобно на гружи адипоцитокени, се секретира правопрпорционално на количеството мастна тъкан и то предимно от клетките на възпалението, които инфилтрират мастната тъкан, а не от самите адипоцити. По отношение на туморигенезата, неговото действие се сравнява с това на висфатина, но върху различен рецептор – Toll-like receptor 4 (TLR4). Пост-рецепторните каскадни пътища на резистина включват активация на PI3K/Akt път, MAPK и про-инфламаторния транскрипционен ядрен фактор kB (NF-kB), водещи до инактивация на про-апоптотични гени и повишена клетъчна преживяемост (Фиг. 7) (32, 42).

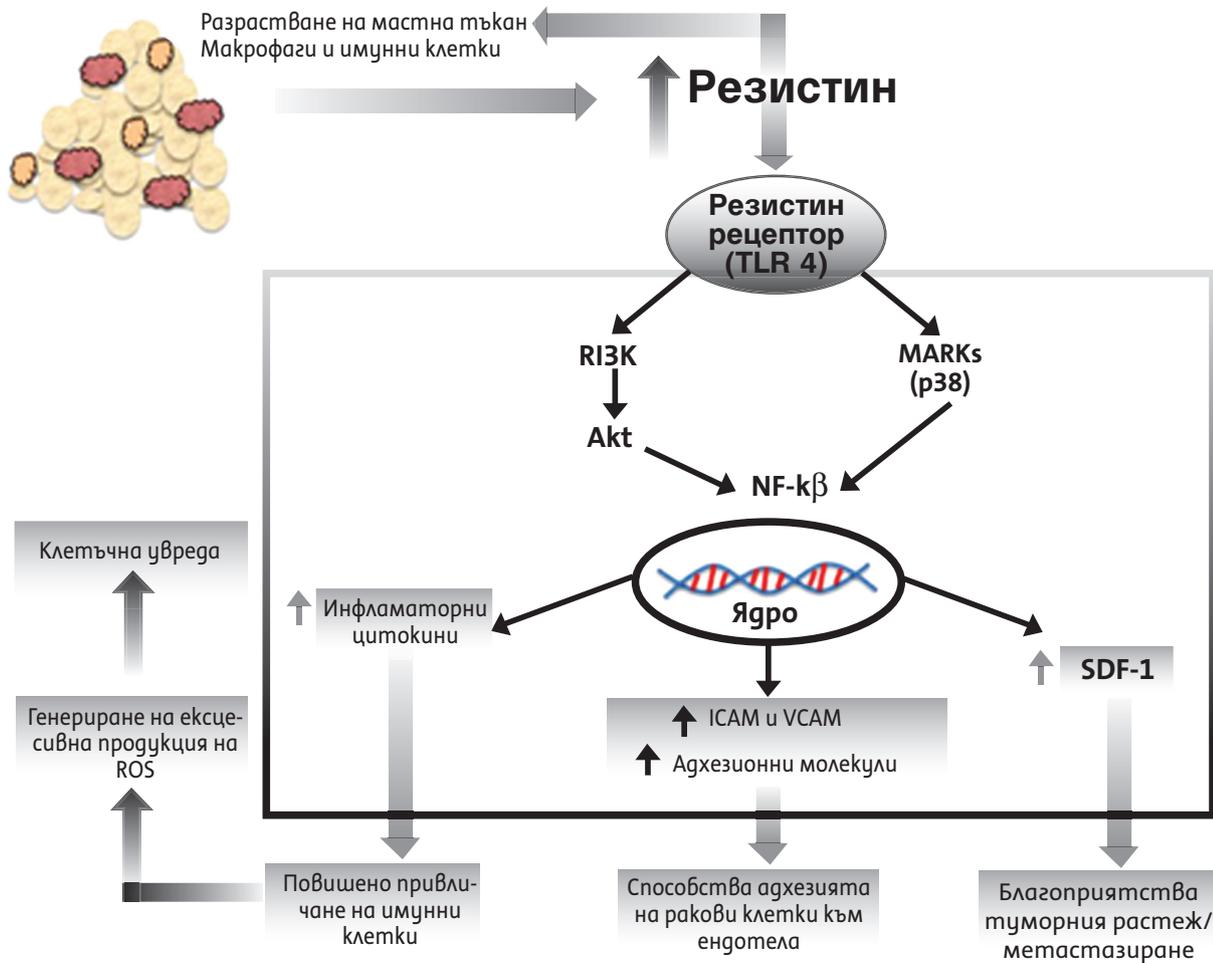
Проучванията доказват асоциацията на повишените нива на резистин с развитието на рак на гърдата, колоректален, простатен и хепатоцелуларен карцином. Критично звено за туморното метастазиране е адхезията към съдовия ендотел, като една от важните патогенни роли на резистина се крие в способността му да индуцира експресията на интрацелуларната адхезионна молекула-1 (ICAM-1) и васкуларната клетъчна адхезионна молекула-1 (VCAM-1), подобрявайки адхезията на туморите към съдовия ендотел и метастазирането (42).

Про-възпалителни цитокини

Мастната тъкан секретира редица полипептиди, функциониращи като про-инфламаторни цитокини – тумор-некротизиращ фактор алфа (TNF α), интерлевкин-6 (IL-6), инхибитор на плазминогеновия активатор-1 (PAI-1) и много други. Повечето от тези цитокини се намесват в инсулиновата пост-рецепторната сигнална каскада, инхибирайки автофосфорилирането на инсулиновия рецептор и инсулин-рецепторния субстрат 1 (IRS 1), като така допринасят за инсулиновата резистентност, съпровождаща затлъстяването. Въпреки първоначално считаното, че тези фактори се секретират от адипоцитите, се оказва, че те са продукт на макрофаги и гружи клетки на имунната система, които инфилтрират мастната тъкан при затлъстяване (2, 75).

TNF α , цитокин за пръв път идентифициран като ендотоксин-индуциран фактор, който причинява туморна некроза, сега е доказано

Фигура 7. Ефекти на резистина при затлъстяване (адаптирано по 42).



асоцииран с карциногенезата, чрез промоция на ангиогенезата, инвазиоспособността и метастазирването. TNF α активира про-инфламаторния NF- κ B, чрез разграждането на неговия инхибитор – I κ B, с който съществуват свързани в цитозолни везикули. NF- κ B също така потиска апоптозата, активира синтеза на адхезионни молекули, матриксни металопроотеинази и способности за различни механизми на тъканната инвазия и метастазирание. Животински модели с делеция на рецептора за TNF α показват, че високо-мазнинната диета и канцерогенът диетил-нитрозамин (DEN) не са способни да причинят хепатоцелуларен карцином, както се развива при животните без делеция на рецептора. Тези данни потвърждават значението на ниско-степенното възпаление и промоторната роля на затлъстяването за туморигенезата (92).

Мета-анализ от 2020 г. показва значително повишена експресия на TNF α (odds ratio =6,36, 95% CI: 1,92 to 21,05, P=0,002) при пациенти с тиреоиден карцином, в сравнение със здрави контроли. Още по-значителна е тъканната свръхекспресия на

лептин при карциномно болните, в сравнение с контролите (OR=12,21, 95% CI: 3,36 to 44,40, P<0,00001) (93).

Друг важен про-инфламаторен цитокин, продуциран от мастната тъкан, е **IL-6**. Циркулиращите му нива корелират строго с ИТМ и има данни, че до 35% от последните при здрави лица произлизат именно от мастната тъкан, като се смята, че при затлъстяване този процент е значително по-висок. IL-6 повишава експортирането на триглицериди от черния дроб към периферните тъкани, инхибирайки същевременно активността на липопротеин липазата, като така се повишава циркулиращите свободни мастни киселини и индуцира инсулинова резистентност.

Освен това, IL-6 е модулатор на редица гени, регулиращи клетъчния цикъл, преживяване и ангиогенеза. Осъществява своята регулация чрез JAK2 киназния път, подобно на лептина, и сигналния трансдюсер и активатор на транскрипцията 3 протеина (STAT3), чиято експресия се повишава също и от лептина (92).

PAI-1 се продуцира в големи количества от адипозната тъкан. Високите му циркулиращи нива се асоциират с по-лоша прогноза при рак на гърдата, а негови инхибитори предотвратяват развитието на дебелочревни полипи и впоследствие малигнизация при животински модели на колоректален карцином. Други модели с индуцирани тумори и делеция на гена, кодиращ PAI-1 - SERPINE1, демонстрират невъзможност за туморен растеж и тъканна инвазия, поради дефицитна васкуларизация. На базата на тези данни се предполага, че повишената експресия на PAI-1 при затлъстяване способства за по-бързата малигнена прогресия, в допълнение на повишения тромботичен риск, обусловен от високите циркулиращи нива на PAI-1 – още един фактор за повишената смъртност при затлъстяване (94, 95).

В заключение, има съществени доказателства, че при хиперплазия и хипертрофия на адипоцитите в мастната тъкан възниква хипоксия, като се смята, че намаляването на тъканната

концентрация на O₂ стои в основата на адипоцитната дисфункция и индуциране на про-инфламаторни сигнали. Развитието на малигнени процеси при затлъстяване може да бъде отключено и стимулирано от хипоксичната и ангиогенна среда на мастната тъкан и последиците от промените на имунния фенотип и циркулиращите нива на основни адипоцитокени. Натрупването на ексцесивна мастна тъкан, особено с абдоминална локализация, причинява вторични промени, свързани с инсулиновата сигнализация и дисрегулацията на липидната обмяна, които също могат да стимулират развитието на рак. Разгадането на молекулярните връзки, свързващи затлъстяването с неблагоприятните метаболитни последици в насока повишен атерогенен и онкогенен риск, може да даде възможност за разработване на превантивни и терапевтични стратегии за намаляване заболяемостта и смъртността при стремгабо нарастващата популация с наднормено тегло в световен план.

References

1. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(8): 327-332.
2. Milcheva B, Orbetzova M. Adipose tissue – an endocrine organ. *Endocrinologia* 2004; 2(9): 64-72. (In Bulgarian) [Милчева Б, Орбецова М. Мастната тъкан – Ендокринен орган. *Ендокринология* 2004; 2 (9); 64-72].
3. Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, et al. Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes Res* 2003; 11:5–16.
4. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009; 360:1509–1517.
5. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: A mini-review. *Gerontology* 2012; 58: 15–23.
6. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009; 360: 1518–1525.
7. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19:1252–1263.
8. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 2009; 460: 259–263.
9. Scheller EL, Cawthorn WP, Burr AA, Horowitz MC, MacDougald OA. Marrow Adipose Tissue: Trimming the Fat. *Trends Endocrinol Metab* 2016; 27:392–403.
10. Proença AR, Sertié RA, Oliveira AC, Campana AB, Caminhoto RO, Chimin P, et al. New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz J Med Biol Res* 2014; 47(3): 192-205.
11. Eto H, Suga H, Matsumoto D, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 2009; 124: 1087–1097.
12. Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur Cell Biol* 2013; 92(6-7): 229-236.
13. Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW Jr. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 1999; 341(15): 1097-1105.
14. Gioulbasanis I, Martin L, Baracos VE, Thezenas S, Koinis F, Senesse P. Nutritional assessment in overweight and obese patients with metastatic cancer: Does it make sense? *Ann Oncol* 2015; 26: 217–221.
15. Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. *Oncogene* 2004; 23:6365–6378.
16. Bhaskaran K, Douglas I, Forbes H, dos-Santos-Silva I, Leon DA, Smeeth L. Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5,24 million UK adults. *Lancet* 2014; 384(9945): 755-765.
17. Ligibel JA, Alfano CM, Courneya KS, Demark-Wahnefried W, Burger RA, Chlebowski RT, et al. American Society of Clinical Oncology position statement on obesity and cancer. *J Clin Oncol* 2014; 32(31): 3568-3574.
18. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348:1625–1638.
19. Basen-Engquist K, Chang M. Obesity and cancer risk: Recent review and evidence. *Curr Oncol Rep* 2011; 13:71–76.
20. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body fatness and cancer—viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* 2016; 375:794–798.
21. Iyengar NM, Gucalp A, Dannenberg AJ, Hudis CA. Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. *J Clin Oncol*. 2016 Dec 10;34(35):4270-4276.
22. Bays H. Central obesity as a clinical marker of adiposopathy; increased visceral adiposity as a surrogate marker for global fat dysfunction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014; 21(5): 345-351.

23. Parlee SD, Lentz SI, Mori H, MacDougald OA. Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. *Methods Enzymol* 2014; 537: 93-122.
24. Simmonds M, Burch J, Llewellyn A, Griffiths C, Yang H, Owen C, et al. The use of measures of obesity in childhood for predicting obesity and the development of obesity-related diseases in adulthood: a systematic review and meta-analysis. *Health Technol Assess* 2015; 19(43): 1-336.
25. Rosenow A, Noben JP, Bouwman FG, Mariman ECp, Renes J. Hypoxia-mimetic effects in the secretome of human preadipocytes and adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1834(12): 2761-2771.
26. Divella R, De Luca R, Abbate I, Naglieri E, Daniele A. Obesity and cancer: the role of adipose tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation. *J Cancer* 2016; 7(15): 2346-2359.
27. Hosogai N, A Fukuhara, K Oshima, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007;56(4):901-911.
28. Petrangeli E, Coroniti G, Brini AT, de Girolamo L, Stanco D, Niada S, et al. Hypoxia Promotes the Inflammatory Response and Stemness Features in Visceral Fat Stem Cells from Obese Subjects. *J Cell Physiol* 2016; 231(3): 668-679.
29. Lee YS, Kim JW, Osborne O, Oh DY, Sasik R, Schenk S, et al. Increased adipocyte O2 consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell* 2014; 157(6): 1339-1352.
30. Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev* 2013; 93: 1-21.
31. Almendros I, Gileles-Hillel A, Khalyfa A, Wang Y, Zhang SX, Carreras A, et al. Adipose tissue macrophage polarization by intermittent hypoxia in a mouse model of OSA: effect of tumor microenvironment. *Cancer Lett* 2015; 361(2): 233-239.
32. Pérez-Hernández AI, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Frühbeck G. Mechanisms linking excess adiposity and carcinogenesis promotion. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5: 65.
33. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(10): 721-732.
34. Nagasawa H. Pathophysiological response to hypoxia - from the molecular mechanisms of malady to drug discovery: drug discovery for targeting the tumor microenvironment. *J Pharmacol Sci* 2011; 115(4): 446-452.
35. Deng T, Lyon CJ, Bergin S, Caligiuri MA, Hsueh WA. Obesity, inflammation, and cancer. *Annu Rev Pathol* 2016; 11:421-449.
36. Park J, Morley TS, Kim M, Clegg DJ, Scherer PE. Obesity and cancer—mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10:455-465.
37. Cozzo AJ, Fuller AM, Makowski L. Contribution of Adipose Tissue to Development of Cancer. *Compr Physiol* 2017; 8(1): 237-282.
38. Lashinger LM, Ford NA, Hursting SD. Interacting inflammatory and growth factor signals underlie the obesity-cancer link. *J Nutr* 2014; 144(2): 109-113.
39. Rutkowski JM, Davis KE, Scherer PE. Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue. *FEBS J* 2009; 276(20): 5738-5746.
40. Rogers CJ, Prabhu KS, Vijay-Kumar M. The microbiome and obesity: an established risk for certain types of cancer. *Cancer J* 2014; 20(3): 176-180.
41. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007; 117(1): 175-184.
42. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster M. Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2015; 21(1): 57-74.
43. Garofalo C, Surmacz E. Leptin and cancer. *J Cell Physiol* 2006; 207(1): 12-22.
44. Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967: 379-388.
45. Sharma D, Saxena NK, Vertino PM, Anania FA. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 629-640.
46. Delort L, Rossary A, Farges MC, Vasson MP, Caldefie-Chézet F. Leptin, adipocytes and breast cancer: Focus on inflammation and anti-tumor immunity. *Life Sci* 2015; pii: S0024-3205(15)00232-5.
47. Tessitore L, Vizio B, Jenkins O, De Stefano I, Ritossa C, Argiles J, et al. Leptin expression in colorectal and breast cancer patients. *Int J Mol Med* 2000; 5: 421-427.
48. Saxena NK, Vertino PM, Anania FA, Sharma D. leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *J Biol Chem* 2007; 282(18): 13316-13325.
49. Catalano S, Marsico S, Giordano C, Mauro L, Rizza P, Panno ML, Andò S. Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line. *J Biol Chem* 2003; 278(31): 28668-28676.
50. Garofalo C, Sisci D, Surmacz E. Leptin interferes with the effects of the antiestrogen ICI 182,780 in MCF-7 breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10(19): 6466-6475.
51. Kim WG, Park JW, Willingham MC, Cheng SY. Diet-induced obesity increases tumor growth and promotes anaplastic change in thyroid cancer in a mouse model. *Endocrinology* 2013; 154(8): 2936-2947.
52. Rehem RA, Elwafa WA, Elwafa RA, Abdel-Aziz TE. Study of serum leptin in well-differentiated thyroid carcinoma: correlation with patient and tumor characteristics. *World J Surg* 2014; 38(10): 2621-2627.
53. Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol* 2016; 8(2): 93-100.
54. Mauro L, Naimo GD, Ricchio E, Panno ML, Andò S. Cross-Talk between Adiponectin and IGF-IR in Breast Cancer. *Front Oncol* 2015; 5: 157.
55. Khan S, Shukla S, Sinha S, Meeran SM. Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; 24(6): 503-513.
56. Nigro E, Scudiero O, Samataro D, Mazzarella G, Sofia M, Bianco A, Daniele A. Adiponectin affects lung epithelial A549 cell viability counteracting TNF α and IL-1 β toxicity through AdipoR1. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(6): 1145-1153.
57. Nakayama S, Miyoshi Y, Ishihara H, Noguchi S. Growth-inhibitory effect of adiponectin via adiponectin receptor 1 on human breast cancer cells through inhibition of S-phase entry without inducing apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 112(3): 405-410.
58. Körner A, Pazaitou-Panayiotou K, Kelesidis T, Kelesidis I, Williams CJ, Kaprara A, et al. Total and high-molecular-weight adiponectin in breast cancer: in vitro and in vivo studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(3): 1041-1048.
59. Bub JD, Miyazaki T, Iwamoto Y. Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340(4): 1158-1166.
60. Chang CY, Chen MJ, Yang WS, Yeh CY, Ho HN, Chen SU, Yang YS. Hypoadiponectinemia: a useful marker of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2012; 51(4): 583-590.
61. Guo XH, Wang JY, Gao Y, Gao M, Yu GY, Xiang RL, et al. Decreased adiponectin level is associated with aggressive phenotype of tongue squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2013; 104(2): 206-213.
62. Kamada Y, Matsumoto H, Tamura S, Fukushima J, Kiso S, Fukui K, et al. Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. *J Hepatol* 2007; 47(4): 556-564.
63. Lu JP, Hou ZF, Duivenvoorden WC, Whelan K, Honig A, Pinthus JH. Adiponectin inhibits oxidative stress in human prostate carcinoma cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2012; 15(1): 28-35.
64. Dubois V, Delort L, Billard H, Vasson MP, Caldefie-Chézet F. Breast cancer and obesity: in vitro interferences between adipokines and proangiogenic features and/or antitumor therapies? *PLoS One* 2013; 8(3): e58541.
65. Hillon P, Guiu B, Vincent J, Petit JM. Obesity, type 2 diabetes and risk of digestive cancer. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; 34(10): 529-533.
66. Panis C, Herrera AC, Aranome AM, Victorino VJ, Michelletti PL, Morimoto HK, et al. Clinical insights from adiponectin analysis in breast cancer patients reveal its anti-inflammatory properties in non-obese women. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382(1): 190-196.

67. Medina EA, Oberheuer K, Polusani SR, Ortega V, Velagaleti GV, Oyajobi BO. PKA/AMPK signaling in relation to adiponectin's antiproliferative effect on multiple myeloma cells. *Leukemia* 2014; 28(10): 2080-2089.
68. Hebbard L, Ranscht B. Multifaceted roles of adiponectin in cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014; 28(1): 59-69.
69. Khandekar MJ, Cohen P, Spiegelman BM. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(12): 886-895.
70. Nagaraju GP, Aliya S, Alese OB. Role of adiponectin in obesity related gastrointestinal carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26(1): 83-93.
71. Słomian G, Świętochowska E, Malinowska-Borowska J, Kasperczyk S, Rogalska A, Nowak P. Association between chemotherapy and plasma adipokines in patients with colorectal cancer. *Pharmacol Rep* 2014; 66(5): 902-907.
72. Gulcelik MA, Colakoglu K, Dincer H, Dogan L, Yenidogan E, Gulcelik NE. Associations between adiponectin and two different cancers: breast and colon. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(1): 395-398.
73. Gonullu G, Kahraman H, Bedir A, Bektas A, Yücel I. Association between adiponectin, resistin, insulin resistance, and colorectal tumors. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 205-212.
74. Beg MS, Saleem S, Turer A, Ayers C, de Lemos JA, Khara A, et al. A Prospective Analysis of Plasma Adiponectin and Risk of Incident Cancer: The Dallas Heart Study. *J Natl Compr Canc Netw* 2015; 13(7):873-878.
75. Ngoc DM, Geneste A, Fallone F, Li X, Dumontet C, Muller C. The fat and the bad: Mature adipocytes, key actors in tumor progression and resistance. *Oncotarget* 2017; 8: 57622-57641.
76. Takahata C, Miyoshi Y, Irahara N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Demonstration of adiponectin receptors 1 and 2 mRNA expression in human breast cancer cells. *Cancer Lett* 2007; 250: 229-236.
77. Yoneda K, Tomimoto A, Endo H, Iida H, Sugiyama M, Takahashi H, et al. Expression of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in normal colon epithelium and colon cancer tissue. *Oncol Rep* 2008; 20: 479-483.
78. Dalamaga M, Migdalis I, Fargnoli JL, Papadavid E, Bloom E, Mitsiades N, et al. Pancreatic cancer expresses adiponectin receptors and is associated with hypoleptinemia and hyperadiponectinemia: a case-control study. *Cancer Causes Control* 2009; 20: 625-633.
79. Chou SH, Tseleni-Balafouta S, Moon HS, Chamberland JP, Liu X, Kavantzias N, Mantzoros CS. Adiponectin receptor expression in human malignant tissues. *Horm Canc* 2010; 1: 136-145.
80. Ollberding NJ, Kim Y, Shvetsov YB, Wilkens LR, Franke AA, Cooney RV, et al. Prediagnostic leptin, adiponectin, C-reactive protein, and the risk of postmenopausal breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013; 6: 188-195.
81. Chen DC, Chung YF, Yeh YT, Chung HC, Kuo FC, Fu OY, et al. Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients. *Cancer Lett* 2006; 237: 109-114.
82. Ashizawa N, Yahata T, Quan J, Adachi S, Yoshihara K, Tanaka K. Serum leptin-adiponectin ratio and endometrial cancer risk in postmenopausal female subjects. *Gynecol Oncol* 2010; 119: 65-69.
83. Stocks T, Lukanova A, Johansson M, Rinaldi S, Palmqvist R, Hallmans G, et al. Components of the metabolic syndrome and colorectal cancer risk; a prospective study. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 304-314.
84. Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res* 2011; 71: 2455-2465.
85. Parida S, Siddharth S, Sharma D. Role of Omentin in Obesity Paradox in Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 2021; 13(2): 275.
86. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290(6): E1253-1261.
87. Yip K-P, Au-Yeung CL, Mok SC. Interactions of Omentin and Lactotransferrin in the Progression of Metastatic Ovarian Cancer. *The FASEB Journal* 2019; 33: 704.5.
88. Zhou L, He W, Wang W, Zhou D. Altered circulating levels of adipokine omentin-1 in patients with prostate cancer. *Oncotargets Ther* 2019; 12: 3313-3319.
89. Karabulut S, Afsar CU, Karabulut M, Alis H, Bozkurt MA, Aydogan F, et al. Clinical significance of serum omentin-1 levels in patients with pancreatic adenocarcinoma. *BBA Clin* 2016; 6: 138-142.
90. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol* 2007; 178: 1748-1758.
91. Buldak RJ, Buldak L, Polaniak R, Kukla M, Birkner E, Kubina R, et al. Visfatin affects redox adaptive responses and proliferation in Me45 human malignant melanoma cells: an in vitro study. *Oncol Rep* 2013; 29: 771-778.
92. Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* 2010; 140(2): 197-208.
93. Zhao J, Wen J, Wang S, Yao J, Liao L, Dong J. Association between adipokines and thyroid carcinoma: a meta-analysis of case-control studies. *BMC Cancer* 2020; 20(1): 788.
94. Mutoh M, Niho N, Komiya M, Takahashi M, Ohtsubo R, Nakatogawa K, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) blockers suppress intestinal polyp formation in Min mice. *Carcinogenesis* 2008; 29: 824-829.
95. Bajou K, Noël A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 1998; 4(8): 923-928.

Съвременен поглед върху генетичната основа на патогенезата на синдрома на поликистозни яйчници (PCOS)

Димова, Иванка И.¹, Фейзулова, Айлин Г.^{2*},³, Василев, Георги В.^{2*}, Орбецова, Мария М.⁴

¹ Лаборатория по геномна диагностика, Център по молекулярна медицина, МУ София

² Медицински Факултет, МУ, Пловдив; ³ Медицински Факултет, МУ, София; ⁴ Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, Катедра по Ендокринология, МФ, МУ, Пловдив

* студент – Кръжок по Ендокринология, Катедра по Ендокринология, МФ, МУ, Пловдив

Постъпване: 02. 08. 2021 / Ревизиране: 06. 09. 2021 / Приемане: 19. 09. 2021

Contemporary View on the Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Pathogenesis

Dimova, Ivanka I.¹, Feyzullova, Aylin G.^{2*},³, Vasilev, Georgi V.^{2*}, Orbetzova, Maria M.⁴

¹ Laboratory of Genomic Diagnostics, Center for Molecular Medicine, MU, Sofia

² Medical Faculty, Medical University, Plovdiv; ³ Medical Faculty, Medical University, Sofia

⁴ Clinic of Endocrinology and metabolic diseases, „Sv. Georgy“ University Hospital, Department of Endocrinology, Medical Faculty, MU, Plovdiv

* medical student – Department of Endocrinology, MF, MU, Plovdiv

Submitted: 02. 08. 2021/Revised: 06. 09. 2021/Accepted: 19. 09. 2021

Резюме

Синдромът на поликистозните яйчници (PCOS) е едно от най-честите ендокринни нарушения, засягащо около 5-14% от жените в репродуктивна възраст и явяващо се водеща причина за стерилитет. Клиничните симптоми на PCOS включват хиперандрогенизъм, овулаторна дисфункция, затлъстяване и метаболитен синдром. Налице е широка хетерогенност във фенотипните изяви и метаболитни усложнения. Патогенезата на PCOS не е напълно изяснена, но четири аспекта изглеждат допринасят в различна степен: инсулинова резистентност с компенсаторна хиперинсулинемия, дисфункция на невроендокринната ос, повишена яйчникова и/или надбъбречна андрогенна секреция, частично спиране на фоликулогенезата.

При PCOS се доказва силен наследствен компонент посредством изучаване на фамилни случаи и близнаци, както и при цялостно-геномно асоциативни (GWAS) проучвания. Понастоящем се счита, че PCOS е полигенно и многофакторно синдромно състояние при съучастие на действието на фактори на околната среда. В етиологията на PCOS се намесват 4 основни молекулни механизми, засягащи: метаболитни и регулаторни пътища за синтеза на стероидни хормони; регулаторни пътища на гонадотро-

Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders, affecting about 5-14% of women of reproductive age and being a leading cause of infertility. Clinical symptoms of PCOS include hyperandrogenism, ovulatory dysfunction, obesity, and metabolic syndrome. There is widespread heterogeneity in phenotype manifestations and metabolic complications. The pathogenesis of PCOS is not fully understood, but four aspects appear to contribute to varying extents: insulin resistance with compensatory hyperinsulinemia, neuroendocrine axis dysfunction, increased ovarian and/or adrenal androgen secretion, partial arrest of folliculogenesis.

PCOS demonstrates a strong hereditary component through the study of family groups and twins, as well as Genome Wide Association Studies (GWAS). PCOS is currently considered to be a polygenic and multifactorial syndrome with the involvement of environmental factors. As the etiology of PCOS revolves around 4 main factors: metabolic and regulatory pathways for the synthesis of steroid hormones; regulatory pathways of gonadotropin action; insulin signaling cascade and pathways regulating body weight, a number of genes (more than 200), related mainly to the

пиновото действие; път на инсулинова сигнализация и пътища, регулиращи телесното тегло. Редица гени (повече от 200), отнасящи се главно до изброените категории, са обект на усилено изучаване като кандидат-гени за PCOS.

В обзора са разгледани съвременните аспекти на патогенезата и генетичната основа на PCOS.

Ключови думи:

синдром на поликистозни яйчници (PCOS), инсулинова резистентност, патогенеза, генетика, цялостно-геномно асоциативни проучвания (GWAS)

listed categories, are the subject of intensive research as candidate genes for PCOS.

The review covers current aspects of the pathogenesis and genetic basis of PCOS.

Key words:

polycystic ovary syndrome (PCOS), insulin resistance, pathogenesis, genetics, Genome Wide Association Studies (GWAS)

Въведение – кратък преглед върху естеството на PCOS

Интересът към синдрома на поликистозни яйчници (PCOS) непрекъснато нараства, поради натрупващите се данни, че той излиза много извън рамките на репродуктивно нарушение (1-4). За първи път е описан през 1935 г. от Irving F. Stein и Michael L. Leventhal като съчетание на двустранно уголемени яйчници с множество кисти и манифестен хирзутизъм, затлъстяване, олиго/амеорея, инфертилитет, като гръбни години се обозначава с тяхното име – синдром на Stein-Leventhal. (5). Терминът PCOS навлиза в литературата през 60-те години на миналия век, когато става ясно, че първоначално описаните клинични промени не се извяват задължително при всички засегнати жени, доказана остава само хистопатологичната картина на яйчниците (2).

Понастоящем PCOS се очертава като едно от най-честите ендокринни нарушения, засягащо около 5-14% от жените в репродуктивна възраст и явяващо се водеща причина за стерилитет (4, 6-8). Точното определяне на разпространението му е затруднено поради използване във времето на различни диагностични критерии, както и поради етнически и расови различия (2, 9, 10). По-висока е честота на синдрома при определени популации жени – със захарен диабет (ЗД) тип 2 (метаболически синдром и с хронична ановулация и амеорея) стерилитет (10-13).

От 2004 г. има общоприети диагностични критерии за PCOS, въведени от Европейско Дружество за Репродукция и Ембриология на Човека (European Society for Human Reproduction and Embryology- ESHRE) и Американско Дружество по Репродуктивна Медицина (American Society for Reproductive Medicine-ASRM), с които работим и в нашата страна. Според критериите на ESHRE-ASRM за поставяне на диагноза PCOS, след

изключване на други причини, са необходими най-малко 2 от 3-те основни елемента – хиперандрогенизъм, който може да е проявен и само клинично, хронична ановулация и ултразвуково диагностичирани поликистозни яйчници (14). Осъвременените критерии за ултразвукова диагноза (УЗД) на PCOS включват наличие на най-малко 1 от следните: 1. Увеличени размери на яйчниците – повече от 10 мм³; 2. Увеличен брой фоликули – най-малко 12 с диаметър от 2 до 10 мм; 3. Достатъчно е изменението да засягат само единия яйчник (15). Ултразвуковото изследване на яйчниците е задължително както за морфологична диагноза на поликистозните яйчници, така и в диференциално-диагностичен план за откриване на съпътстващи заболявания.

На база съчетанието на посочените диагностични елементи клинично са обособени 4 фенотипни изяви на PCOS: Фенотип А и Фенотип В, често наричани „класически PCOS“ включват хиперандрогенизъм и овулаторна дисфункция със (Фенотип А) или без (Фенотип В) УЗД данни за поликистозни яйчници (PCO), Фенотип С, наричан още „овулаторен PCOS“ (хиперандрогенизъм+PCO), Фенотип D, или „не-хиперандрогенен PCOS“ (овулаторна дисфункция + PCO) (4, 10). В ежедневната практика фенотиповете А и В, т.е. „класическите“ форми на PCOS, обикновено са най-честите, срещащи се в около две трети от жените, диагностицирани с PCOS. Важно е, обаче, да се отбележи, че обикновено преценката за разпространение на PCOS-фенотиповете се базира на прегледи и изследвания в клинична обстановка, което носи някои неточности, в сравнение с научно-изследователските проучвания със строг дизайн и точни включващи и изключващи критерии. В проучване при реферирани българска популация жени с PCOS честотата на фенотиповете А, В, С и D е както следва: 58,6%, 11,4%, 20,0% и 10,0%, съответно (16). Жените с Фенотип А и В са с по-голяма честота на наднормено

Патогенетични аспекти на PCOS

тегло и, съответно с по-висока степен на инсулинова резистентност в сравнение с другите 2 фенотипа (16, 17). Трябва да се има въпредвид, че едно проспективно проучване на Carmina и сътр. при реферирана PCOS популация в продължение на повече от 20 години, показва намаляване честотата на по-тежките фенотипни изяви, подобряване на овулаторната дисфункция и на степента на хиперандрогенемия при проследяваните жени до към четвъртото десетилетие от живота им (18). Като цяло, от решаващо значение е, когато се оценява рискът от дългосрочни последици и усложнения на PCOS, да се вземе въпредвид съществуването на разнообразни фенотипни изяви и съответното им различно влияние според възрастта на засегнатите жени и характера на популационната извадка.

През изминалите над 85 г. разбиранията за естеството на синдрома търпят промени: заболяване свързано с морфологични и функционални овариални промени; заболяване свързано с оста хипоталамус – хипофиза – яйчник; метаболитен синдром, специфичен за женския пол, в основата на който лежи инсулиновата резистентност (1-4). Изключително голямата хетерогенност на синдрома отразява действието на множество патофизиологични механизми и понастоящем се счита, че PCOS възниква в резултат на „порочен кръг“, който може да бъде отключен от всеки един от тези механизми и да се поддържа и задълбочава от останалите. Нарушенията в отделните елементи на този цикъл водят до едни и същи последици: *повишена овариална андрогенна продукция и ановулация* (1-4, 19, 20). Все повече доказателства излизат на преден план за ролята на *висцералното затлъстяване и адипоцитокините*, която се дискутира от някои автори като причина за PCOS или много ранен ефект на заболяването. Дори се прокрадва идеята, че при затлъстелите жени с PCOS нарушението може би възниква по време на интраутеринното развитие и зависи от майчини фактори и теглото при раждане. Но тази хипотеза подлежи на потвърждаване (20-23).

Жените с PCOS са с повишен риск от развитие на сърдечно-съдови заболявания, вкл. хипертония и хипертония по време на бременност, ЗД тип 2, намалена костна минерална плътност, депресия и тревожност, обструктивна сънна апнея, ендометриален и овариален карциноми и някои акушерски усложнения. Всички компоненти на метаболитен синдром, които се наблюдават в различни съчетания при значима част от жените с PCOS (вкл. висцерално затлъстяване, инсулинова резистентност, с компенсаторна хиперинсулинемия, дисгликемия, повишени нива на атерогенни и понижени нива на антиатерогенни адипоцитокини) са свързани с повишен риск от поява и на редица свързани с наднорменото тегло карциноми, с еволюирането им към крайни стадии и с по-лошата им прогноза (2, 7, 20, 24).

Единно становище относно патогенезата на синдрома все още липсва, макар че се натрупват многобройни проучвания от цял свят. Предложени са няколко теории, като всички хипотези са подкрепени с експериментални и клинични данни:

1. *Уникален дефект в инсулиновото действие и секреция, което води до инсулинова резистентност и хиперинсулинемия;*

2. *Първичен невроендокринен дефект, предизвикващ усилване на пулсовата честота и амплитудата на LH;*

3. *Форма на гонадотропин-зависим овариален хиперандрогенизъм, при който централната аномалия е дефект в синтеза на андрогените с резултат повишена овариална андрогенна продукция;*

4. *Повишена адренална андрогенна продукция, вероятно поради нарушение в метаболизма на кортизола;*

5. *Генетични фактори.*

Много доказателствен материал беше натрупан в последните десетилетия относно *връзката между PCOS и инсулиновата секреция и действие*. Повечето пациентки с PCOS имат инсулинова резистентност и компенсаторна хиперинсулинемия, независимо от телесното тегло. Установена е положителна корелационна връзка между нивата на инсулина на гладно и андрогените като тежестта на хиперинсулинемията корелира с тежестта на клиничната симптоматика на синдрома. Кое от двете нарушения е първо и кое-последващо, е неизвестно. Понастоящем, обаче, се приема с голяма вероятност, че ендогенните андрогени не играят централна патофизиологична роля за инсулиновата резистентност, а по-скоро обратното - нарушенията в действието на инсулина водят до повишаване на андрогените (2, 3, 7). (Фиг. 1, Табл. 1).

Няколко патофизиологични механизма водят до инсулинова резистентност: периферна тъканна резистентност, намален чернодробен клирънс и повишена β -клетъчна чувствителност. Намалената инсулинова чувствителност е съчетана с β -клетъчна дисфункция – повишена инсулинова секреция на гладно и намалена посттрандиално, както при ЗД тип 2, и е особено изразено при пациентки с първостепенни родственици със ЗД тип 2. Нормализирането на телесното тегло повлиява благоприятно инсулиновата резистентност, но дефектът в бета-клетъчната секреция на инсулина остава, което предполага, че нарушението е характерно за PCOS. Първоначално инсулиновата резистентност беше свързана с инсулиновия рецептор, но на настоящия етап се приема, че при жени с PCOS функциониращият инсулиновия рецептор е нормален. Нарушенията се установяват в пост-рецепторното сигнализиране. Тирозин-авто-фосфорилирането повишава

Таблица 1. Ефекти на инсулина върху овариалната функция

Ефект	Орган
Директна стимулация на стероидогенезата	яйчник
Действа синергично на LH и FSH за стимулиране на стероидогенезата	яйчник
Стимулира 17 α -хидроксилазата	яйчник
Стимулира или инхибира ароматазата	яйчник
Регулира рецепторите на LH („up“-регулация)	яйчник
Потенцира овариалния растеж и образуването на кисти синергично с LH/hCG	яйчник
Регулира инсулиновите рецептори („down“-регулация)	яйчник
Инхибира продукцията на IGFBP-1	яйчник, ч. гроб

тирозин-киназната активност на рецептора, докато серин-фосфорилирането я подтиска. Тирозин-фосфорилираният инсулинов рецептор фосфорилира вътреклетъчните субстрати IRS-1 и IRS-2 като по този начин се извършва пренасяне на сигнала и се осъществяват плеиотропните ефекти на инсулина. Някои автори (1) намират, че 50% от жените с PCOS имат повишена инсулин-зависима серин-фосфорилация на β -субединицата на инсулиновия рецептор в клетъчни култури от кожни фибробласти и скелетен мускул. Така, Book и Dupaif (25), проучват метаболитните и митогенни ефекти на инсулина и IGF-1 в култури от фибробласти от жени със заболяването. Авторите стигат до извода, че: а) е налице селективен дефект в метаболитния, но не и митогенния път; б) подобен е дефектът в действието на IGF-1, което означава, че инсулинът и IGF-1 стимулират синтеза на гликогена по общ пострецепторен път; в) IRS-1-свързаната фосфатидил/инозитол 3-киназна активност от инсулина и IGF-1 е нормална, следователно дефектът е или под това звено или по друг път (25).

В обобщение, серин-фосфорилираният инсулинов рецептор има нарушена сигнална трансдукция и следователно води до дефект в действието на инсулина (2, 7, 20). Приема се, че дефектът засяга само глюкозния метаболизъм, докато другите биологични ефекти на инсулина, вкл. върху стероидогенезата не са нарушени (23). Заслужава да се отбележи, че серин-фосфорилирането на IRS-1 е част от TNF- α медираната инсулинова резистентност при затлъстяване (26). Серин-фосфорилирането увеличава активността на един ключов за андрогенната биосинтеза регулаторен ензим – P415c17 в яйчиците и надбъбрека. Следователно, възможно е дефектът в серин-фосфорилирането да води и до инсулинова резистентност, и до хиперандрогенизъм при жени с PCOS (2, 17, 20).

Въпреки доказателствата, че инсулинът усилва андрогенната продукция при PCOS, точният клетъчен механизъм остава неясен. Първоначално се приемаше наличието на кръстосана

реакция със структурно сходния рецептор на IGF-1 (27) върху овариалните тека-клетки. Афинитетът на свързване на инсулина с рецептора за IGF-1 е 50-500 пъти по-нисък, което би означавало, че стимулирането на този рецептор от инсулина би изисквало много високо серумно ниво. Допусна се наличието на хибриден рецептор, който би свързвал с еднакъв афинитет инсулина и IGF-1 (28). Проучванията на Willes и Franks (29) с използване на антитела към инсулиновия и IGF-1 рецептор, показаха, че ефектът на инсулина върху стероидогенезата на човешки гранулоза-клетки *in vitro* е единствено посредством собствения му рецептор.

Логичен понастоящем, но открит остава въпросът, ако инсулиновата резистентност и хиперинсулинемията имат есенциална патогенетична роля при PCOS, то защо всички носители на синдрома не са инсулинорезистентни, защо всички засегнати с хиперинсулинемия не са и с хиперандрогенизъм? Защо яйчникът се явява инсулин-чувствителен при инсулин-резистентно състояние? Дали инсулинът активира отделна от глюкозния транспорт сигнална система, стимулираща стероидогенезата? Редица проучвания подсказват, че инсулиновата резистентност и репродуктивните нарушения са проява на различни генетични дефекти, че намалената инсулинова чувствителност демаскира синдрома при генетично предразположени жени и по тази причина, жени с хиперандрогенизъм и хронична ановулация са инсулин-резистентни.

Според *невроендокринния модел на PCOS* разнообразни фактори, които повлияват секрецията на GnRH и LH се считат за първични в патогенезата на синдрома. Хипотезите могат да се групират в две основни категории: а) гонадотропинови аномалии; б) невроендокринни промени, водещи до нарушена секреция на GnRH. Невроендокринните GnRH механизми, контролиращи базалната и цикличната гонадотропинова секреция, протичат в медико-базалния хипоталамус, който регулира менструалната цикличност.

Нормалната гонадотропинова секреция зависи от освобождаването на GnRH от зоната на нуклеус аркуатус – основната структурна единица на медио-базалния хипоталамус. При овулаторни цикли увеличаването на честотата на освобождаване на GnRH по време на фоликулиновата фаза способства синтеза на LH преди отскока му, докато след овулацията лутеалните стероиди забавят пулсовете на GnRH, което благоприятства синтеза на FSH (30).

Честа биохимична находка при жени с PCOS, считана от много автори за една от характеристиките на синдрома, е несъответно повишената секреция на LH – базална и в отговор на GnRH, и ниското или нисконормално ниво на FSH, имащо за резултат повишено съотношение LH/FSH. Счита се, че повишените нива на LH се дължат отчасти на повишена чувствителност на хипофизата към стимулация от GnRH, изразяваща се в увеличаване на пулсовата честота и амплитуда на LH, но главно на амплитудата (31). Характерът на гонадотропиновата секреция (висок LH и нисък до нормален FSH) може да се дължи също на повишена пулсова честота на секрецията на GnRH, отдаваща се на редукция на хипоталамичната опиоидна инхибиция поради хроничен недостиг на прогестерон (32). Изглежда, че е налице нарушена активност и на хипоталамично, и на хипофизарно ниво (2).

Много автори приемат алтернативен модел на PCOS като форма на *гонадотропин-зависим овариален хиперандрогенизъм*, при който централната аномалия е повишена интраовариална андрогенна концентрация. В човешкия овариален фоликул биосинтезата на андрогени се осъществява основно в клетките на тека-интерна в отговор на стимулация от LH. Тека-клетките експресират CYP17 гена, който кодира P450c17 – ензим, притежаващ 17 β -хидроксиллазна и C17,20-лиазна активност, необходими за превръщането на прегненолона в 17 α -хидроксипрегненолон и DHEA и за превръщането на прогестерона в 17 α -хидроксипрогестерон. Тека-клетките експресират също и StAR – стероидогенен акутен регулаторен протеин, който способства транслокацията на холестерол върху вътрешната митохондриална мембрана и P450scc (ензим отцепващ страничната верига на холестерола), 3 β -хидроксистероиддехидрогеназа тип II и 17 β -хидроксистероиддехидрогеназа тип V, всеки от които е необходим за андрогенната биосинтеза. В човешкия яйчник андрогенната биосинтеза протича основно по Δ 5 стероидния път с метаболизиране на прегненолона в 17 α -хидроксипрегненолон и DHEA посредством комбинираното действие на 17 α -хидроксиллазата/C17,20 лиазата (гезмолаза) и конверсия на DHEA в андростендион и тестостерон посредством 3 β HSD и 17 β HSD, тъй като тека-клетките метаболизират 17ОН-прегненолона

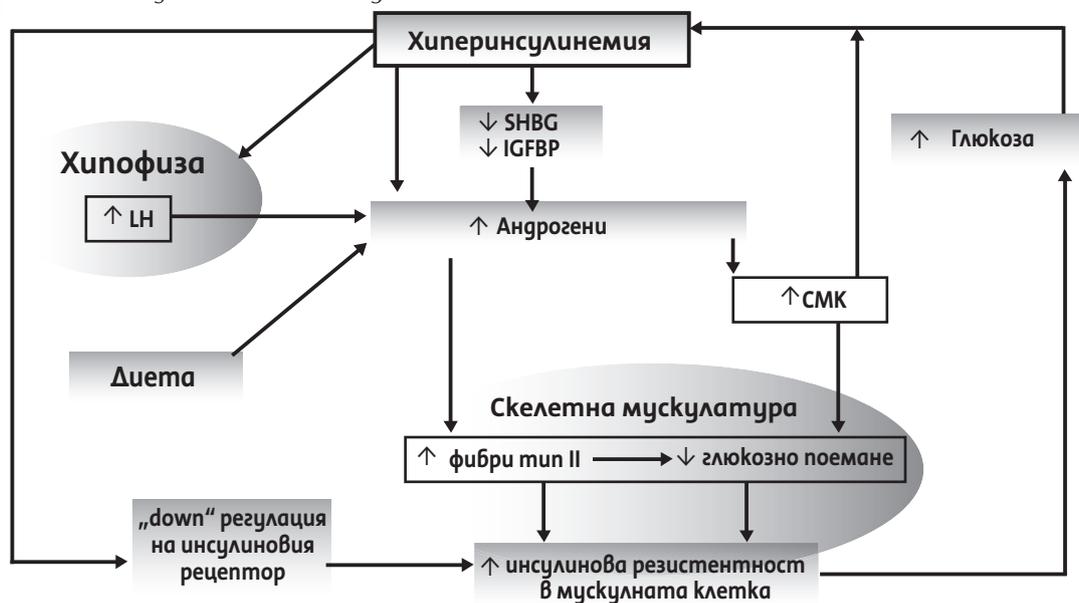
по-ефективно в сравнение със 17ОН-прогестерона. Основният път на стероидна биосинтеза в корпус лутеум е Δ 4 пътят, който включва конверсия на прегненолона в прогестерон (2).

Oddunsi и Kidd (33) обобщават последиците върху яйчника от невроендокринната дисрегулация по следния начин: 1. Високите нива на циркулиращ LH причиняват увеличаване на растежа на тека-клетките в развиващите се фоликули, което води до свръхпроизводство на андрогени и фоликуларна атрезия; 2. Недостатъчен биоактивен FSH във фоликуларната микросреда, дисфункционален FSH рецепторен сигнален трандукционен механизъм или наличие на инхибитори на ензима като епидермален растежен фактор и инсулиноподобен растежен фактор (IGF)-свързващ протеин 3, което води до субнормална индукция на цитохром P450 ароматаза в гранулозните клетки с резултат повишени нива на андрогени; 3. Нарушения в автокринно паракринната система на растежните фактори – IGF/инсулинова система. Ефектите на IGF включват повишена овариална клетъчна митоза, инхибиране на апоптозата и повишаване на стероидогенезата главно чрез повишаване на P450scc ензимната активност и синергично с LH осъществяват „ир“-регулация на P450c17 (33) (Фиг. 2).

Интересен е фактът, че естеството на експресия на компонентите на IGF във фоликуларната течност от поликистозни яйчници е подобна на наблюдаваната в атретични фоликули, което се свързва с лимитиране на активността им при PCOS (34). Растежният хормон сам по себе си може да бъде включен в генезата и поддържането на хиперандрогенната хронична овулация и морфологичните промени в яйчниците, поне при подгрупа слаби жени с PCOS, при които се установява, че секрецията му е повишена (23). Действието на растежния хормон върху IGF и свързващите ги протеини е сходно на действието на инсулина (35).

Анти-Мюлеровият хормон (AMH) с произход от гранулоза-клетките, е основният хормонален паракринен инхибитор на прогресията на примордиалните фоликули. AMH е хомодимерен гликопротеин и принадлежи към семейството на трансформиращ растежен фактор β (TGF- β). Генът му се намира на късото рамо на 19 хромозома. Крайният резултат от генната експресия е прекурсорен протеин – прохормон, който чрез протеолитично разцепване формира биологично активната форма на хормона – AMH (NC). N-терминалният участък е отговорен за секрецията на AMH, а C-терминалният край – за биологичната активност и афинитета за свързване със специфичния рецептор (AMHR) (36), който е трансмембранен протеин със серин-треонин киназна активност. Известни са 2 вида рецептори за хормона – AMHRI и AMHRII. AMH се продуцира

Фигура 1. Роля на инсулина в патогенезата на PCOS.



от овариалните гранулоза клетки от 36 г.с. по време на бременността до менопаузата. В неонаталния период нивата на хормона са ниски, отбелязват леко покачване няколко седмици след раждане и достигат пик около 25 годишна възраст, след което прогресивно намаляват до настъпване на менопауза (39). Преантралните и малките антрални фоликули 2-8 мм са с най-висока експресия на хормона. С навлизането във ФСХ-зависимите фази на развитие (8-10 мм), синтезата се преустановява и в големите антрални и преовулаторни фоликули нивата на AMX са недоловими (38). В атретичните фоликули и корпус лутеум липсва експресия на AMX. *In vivo* AMX потиска чувствителността на фоликулите към FSH и има роля в селекцията на доминантен фоликул. На молекулярно ниво AMX потиска FSH-индуцираната ароматазна активност на гранулоза-клетките, намалявайки конверсията на тестостерона в естрадиол, което резултира в потискане на AMX. В допълнение към стимулиращия си ефект върху тека-клетките за производство на тестостерон, върху гранулоза-клетките LH директно намалява експресията на AMHRII. Основната роля на AMX е участието му в регулацията на растежа и развитието на фоликулите – инхибиране на ранния фоликуларен подбор, по този начин предпазване от преждевременно изчерпване на овариалния резерв. AMX, заедно с антралния фоликуларен брой (AFC), FSH, Инхибин В и овариалния обем, са основни биомаркери на овариалния резерв (40).

При PCOS растежът на фоликулите е прекратен и фоликуларното развитие е нарушено, супресирани са FSH и е невъзможна селекцията на доминантен фоликул (7). Във връзка с повишения брой на преантралните и малките антрални фоликули нивата на AMX са 2 до 4 пъти по-високи,

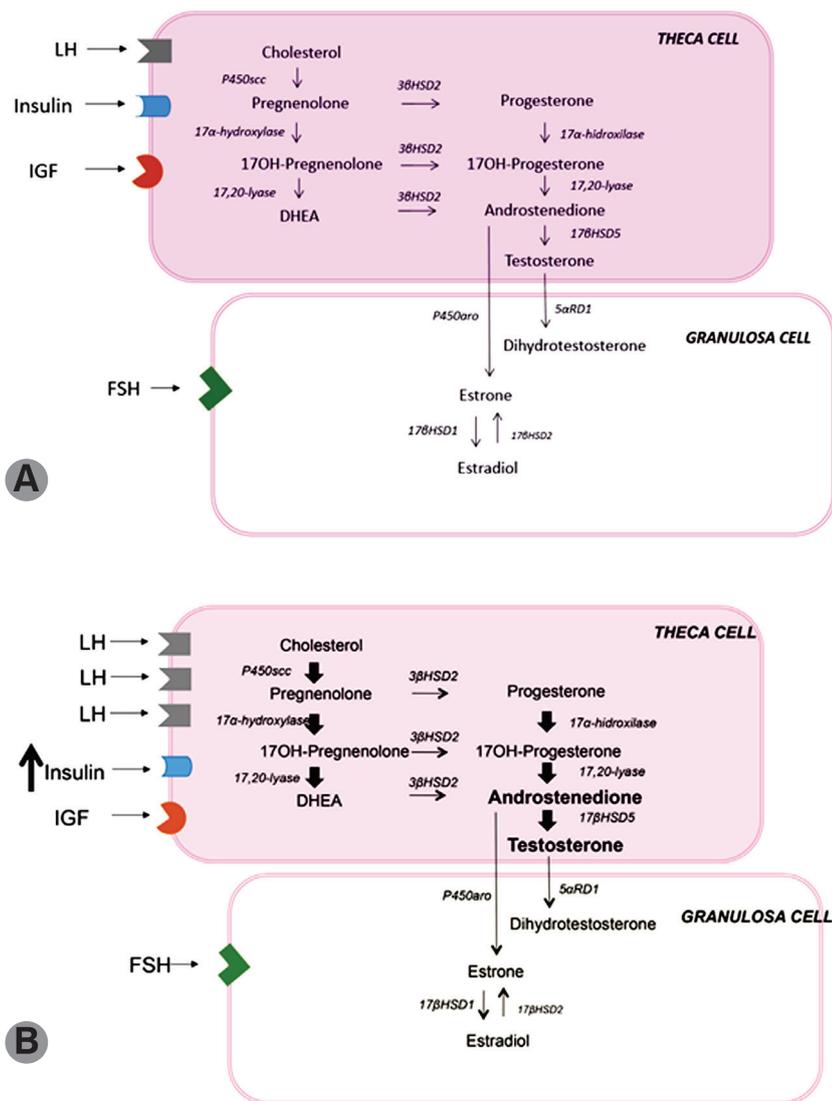
като AMX е не само маркер за фоликуларен брой, а пряк участник в патогенезата на PCOS (41). В малките антрални фоликули FSH стимулира AMX секреция при липса на експресия на ароматаза. При по-големите фоликули с увеличаване нивата на естрадиол и предстоящата селекция на доминантен фоликул, се потиска експресията на AMX – индиректен инхибиращ ефект на FSH. При големите фоликули в поликистозните яйчници липсва на FSH-индуцирана естрадиолова продукция, както и високите нива на AMX водят до фоликуларен арест. Доказано е, че AMX повишава нивата на LH чрез свързване с AMX-рецептори, открити в GnRH невроните в хипоталамуса (42). При пациентки с PCOS, AMX инхибира освобождаването на FSH, паралелно на увеличаване секрецията на LH, водейки до увеличение на съотношението LH: FSH, което е класическа характеристика на PCOS (43).

Изказана е и хипотеза, че бременните жени с PCOS и повишени нива на AMX са с повишен риск за предаване на предиспозиция за развитие на симптома и в потомството (40).

Теорията за PCOS като предимно функционален овариален хиперандрогенизъм (FOH) е доразвита от Rosenfield и Ehrmann, които я систематизират в пространен обзор (44). Има убедителни *in vitro* доказателства за присъщ (интринзичен) дефект в тека-клетки от яйчници на жени с PCOS („класически PCOS“), който може да обясни свръхпроизводството на андрогени и наблюденията *in vivo* стероидогенен секреторен модел. Този дефект е независим от нормалните ендокринни и паракринни регулаторни процеси. След дългосрочен пасаж на клетъчната култура, тези клетки свръхекспресират повечето ензими на стероидогенезата, по-специално цитохром P450c17.

Фигура 2.

Регулация на стероидогенезата в овариалните тека и гранулоза клетки при здрави жени (А) и жени с PCOS (В).



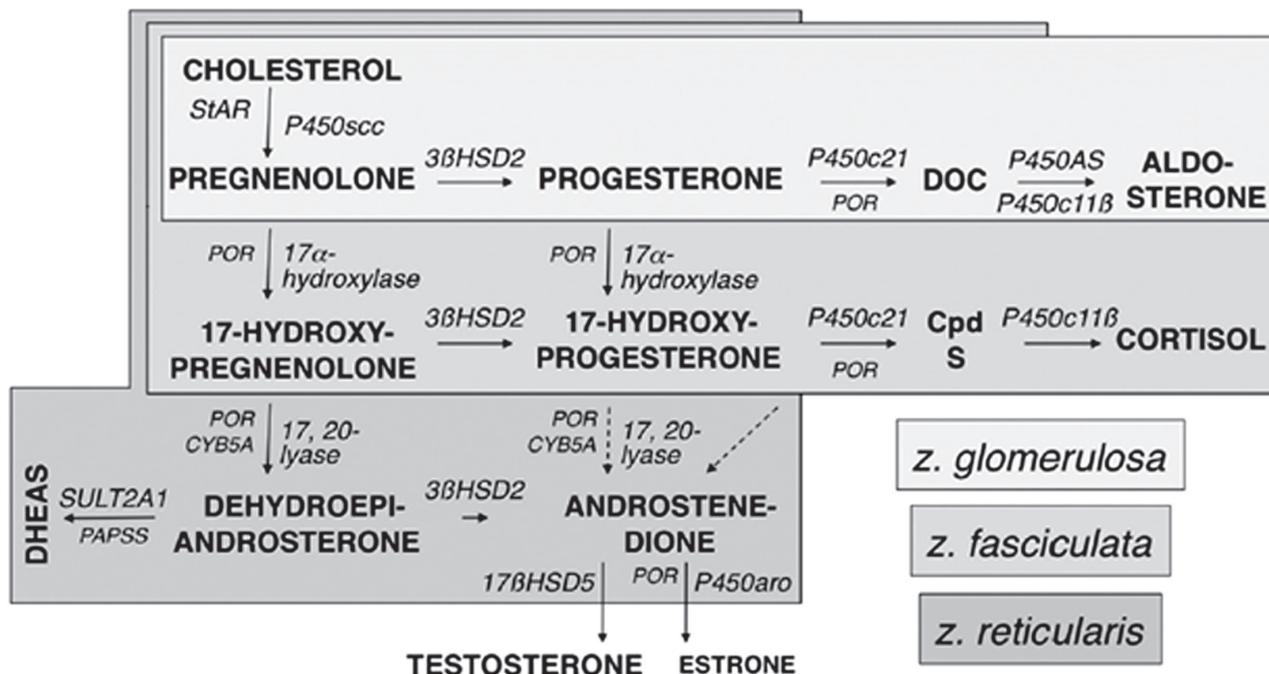
Изглежда, че дисфункцията на гранулоза-клетките допринася за свръхпроизводството на андрогени от тека-клетките. Натрупаните данни предполагат паракринни дефекти в FSH-инхибирането на функцията на тека-клетките, които включват инхибин-В и вероятно други, все още неидентифицирани фактори. Гранулоза-клетките преждевременно лутеинизират предимно в резултат от излишъка на андрогени и инсулин. Фоликулогенезата е прекомерно усилена – маркер са множествените яйчникови кисти и високият AMH. Въпреки че този процес може да е вследствие излишъка от андрогени, не може да се изключи възможността аномалиите да бъдат проява на специфичен дефект в интраовариалното регулиране на фоликулогенезата при PCOS (40).

Адреналната андрогенна секреция – базална и след стимулация с АСТН, е популационно хетерогенна и генетично детерминирана. При 20-30% от жените с PCOS се наблюдава повишена адренална

андрогенна продукция, като при многоносителки на синдрома се наблюдава и повишен отговор на адреналната жлеза към АСТН (Фиг. 3). Адреналният андрогенен излишък при PCOS може да отразява вродена аномалия на стероидогенезата, която предразполага към развитие на заболяването. Могат да играят роля и други интра-адренални фактори, напр. кръвоснабдяване и създаване на надбъбречната кора. Съществува и друга алтернатива – повишените нива на адреналните андрогени при PCOS може да отразяват едно диспропорционално разпределение на жените с вродено най-високи нива на адреналните андрогени измeждy носителките на PCOS. Има и доказателства, че адреналните андрогени се регулират от екстра-адренални фактори. Основни между тях са овариалните стероиди, принципно овариалните андрогени. Много изследователи намират намаляване на нивата на DHEA-S с 20-25% след потискане на овариалната стероидогенеза с дългодействащ GnRH аналог при жени с PCOS и базално повишен DHEAS (45). Въпреки това, супресията само с GnRH аналог рядко може напълно да нормализира повишената адренална андрогенна продукция, което предполага намеса и на други фактори – пролактин, растежен хормон, β -ендорфини, инсулин (46).

Обсъжда се и *нарушение в кортизоловия метаболизъм* като причина за повишената адренална андрогенна продукция при PCOS. Основните метаболитни пътища на кортизола включват необратимо инактивиране от 5 α - и 5 β -редуктазата в черния дроб и обратимо превръщане в кортизон посредством 11 β -хидроксистероиддехидрогеназата (11 β HSD) в черния дроб и мастната тъкан. Двамата изоензима на

Фигура 3. Регулация на стероидогенезата в надбъбречната кора при PCOS.



11βHSD (11βHSD1 и 11βHSD2) катализират обратното превръщане на активния кортизол в неактивния кортизон и обратно. 11βHSD1 е оксоредуктаза и е отговорна за реакцията кортизон-кортизол – нарушенията в действието ѝ водят до повишен метаболитен клирънс на кортизола. Според тази теория повишеният метаболитизъм на кортизола посредством повишена активност на 5α-редуктазата, т.е. повишено инактивиране на кортизола или поради нарушение в действието на 11βHSD с последваща влошена регенерация на кортизол на принципа на отрицателната обратна връзка водят до компенсаторно увеличаване секрецията на ACTH с последваща свръхактивност на надбъбречната кора. Така се поддържа в норма нивото на кортизола, но за сметка на ексцесивна секреция на андрогени (Фиг. 4).

При анализ за обширни проучвания при жени с PCOS Rosenfield и Ehrmann (44) откриват, че типичната характеристика при голямото мнозинство жени с PCOS (87%) е функционален овариален хиперандрогенизъм (FOH). Когато са дефинирани с необяснима от други причини хиперандрогенна олигоановулация, две трети от случаите на PCOS са с типичен FOH характеризиращ се със свръхчувствителност на 17-хидроксипрогестерона към стимулиране от агонисти на GnRH или hCG (човешки хорионгонадотропин). Две трети от останалите случаи с PCOS имат FOH, който се доказва чрез персистиране

на повишения тестостерон след потискане на надбъбречнокоробите андрогени с дексаметазон супресионен тест. Около 3% от случаите с PCOS имат изолиран функционален надбъбречен хиперандрогенизъм (FAH). Останалите случаи са леки и нямат данни за секреторни стероидни аномалии; повечето от тях са със затлъстяване, като увеличаването на мастната тъкан благоприятства развитието на синдрома. Приблизително половината от здравите жени с поликистозна яйчникова морфология (PCOM) имат субклинични дефекти в стероидогенезата, свързани с FOH (44).

Генетични фактори в етиологията на PCOS

Патогенезата на PCOS все още не е изяснена, но струпуването на случаи в определени фамилии предполага генетично участие. Изследванията при роднини от първа степен на жени, засегнати от PCOS, категорично показват влияние на генетични фактори, но все още не е установен ясен начин на унаследяване (47). Установява се голяма вариабилност на фенотипа, както в едно и също семейство, така и между семействата на жени с PCOS, което силно затруднява изследванията по изясняване на участващите генетични фактори. Някои проучвания показват етиологичната роля на мутация в един ген, предаваща се по автозомно-доминантен път с вариабилна експресивност и непълна пенетрантност, докато други са в подкрепа на участието на много гени.

Най-вероятният модел е този на полигенен многофакторен признак, при който се включват множество гени в съчетание с действието на фактори на средата (48). Едни от най-популярните подходи за идентифициране на гени, играещи роля при PCOS, са анализите за скаченост (linkage analysis) и асоциативните анализи. Проучване посочва силния принос на генетичните фактори към PCOS и показва, че моделът, включващ натрупващи се генетични фактори и фактори на околната среда, е най-правдоподобният. В този модел влиянието на генетичните фактори за PCOS се оценява на 72%. Високата наследственост се потвърждава от резултатите от мултивариантен генетичен анализ, който има по-голяма сила да открива генетични влияния (49).

Изследванията при близнаци са особено подходящи при този тип проучвания. Дизиготните (DZ) близнаци, подобно на обикновените братя и сестри, средно споделят 50% общи гени, докато монозиготните (MZ) близнаци споделят всичките си гени. По-високата асоциация за PCOS при MZ близнаци, в сравнение с DZ близнаци и братя/сестри, показва влияние на генетични фактори. Данните от близначните проучвания позволяват да се разграничи влиянието на генетичните фактори и факторите на околната среда върху фенотипните вариации при гаген признак (50). Колкото по-голямо е генетичното влияние, толкова по-голяма корелация ще има при MZ, отколкото при DZ / братя/сестри. Влиянието на околната среда може да бъде уникално за отделните индивиди или да бъде споделяно от членовете на едно и също семейство. Влиянието на околната среда, споделяно от братята/сестрите, израстващи в едно и също семейство, ще доведе до корелации между MZ, DZ и братя/сестри в еднаква степен. Уникалните влияния на околната среда няма да предизвикат прилика сред братята/сестрите.

PCOS е изключително хетерогенно и комплексно заболяване. Генетичната основа на PCOS може да бъде различна между отделните семейства и дори в едни и същи семейства, но обикновено показва връзка с определен патогенетичен път. Проучване на 37 кандигат-гени, свързани с известните патогенетични пътища при PCOS, показва асоциация с гена за фолиостатин и предполагаща асоциация с *CYP11A* гена (51). Други проучвания не успяват да потвърдят тези асоциации (52). Кандигат-гени за PCOS са също гените, участващи в биосинтеза и метаболизма на андрогените, гени, участващи във фоликулогенезата, и гени, свързани със секрецията и действието на инсулина (53).

Генетичната предразположеност от различните гени се изразява различно дори при пациенти от едно и също семейство (54). Геномният скрининг за търсене на кандигат-гени при комплексно заболяване като PCOS е доста нереа-

листичен. Анализът за скаченост в засегнати семейства обикновено дава отрицателни резултати. При такова заболяване най-подходящи са проучванията тип случаи-контроли при по-многобройни популации и цялостно-геномни асоциативни проучвания (GWAS), за да се намерят възможни асоциации. Родителският анализ при такива заболявания често е непрактичен. Проведени са редица проучвания в множество семейства, за да се открие патологичен ген/мутация, но досега не се съобщава за категорична роля на единична генна мутация. Всички гени/мутации, съобщени при фамилен агрегация, показват ниска пенетрантност, свързана с други генетични, хормонални или фактори на околната среда, които в съвкупност водят до заболяването. Проучванията заключават, че PCOS е полигенно и многофакторно синдромно състояние.

Тъй като в етиологията на PCOS се намесват основно 4 молекулни пътища: *метаболически и регулаторни пътища за синтеза на стероидни хормони; регулаторни пътища на гонадотропиновото действие; път на инсулинова сигнализация и пътища, регулиращи телесното тегло*, редица гени (повече от 200), отнасящи се главно до изброените категории, са обект на усилено изучаване като кандигат-гени за PCOS. Но до момента няма еднопосочност на резултатите и единомислие между изследователите.

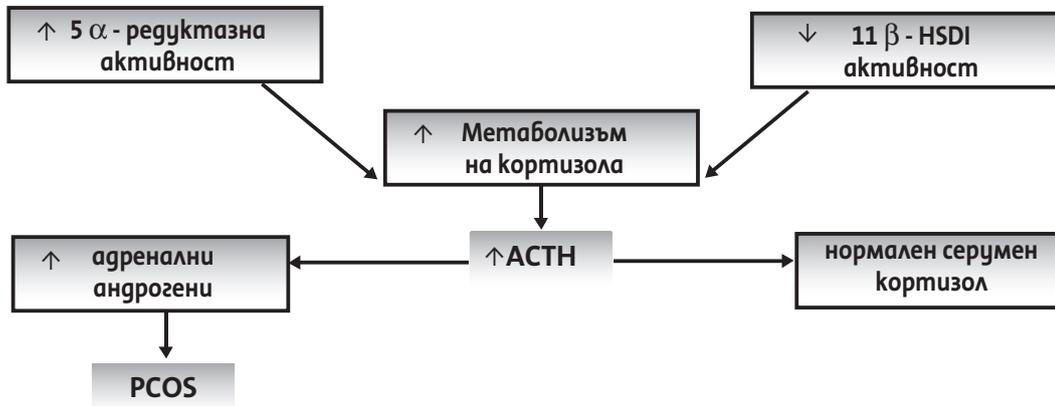
1. Гени, участващи в овариалната и адренална стероидогенеза

Най-често срещаното ендокринно разстройство, свързано с PCOS, е повишаването на нивата на андрогените. Изследвайки причината за повишените нива на андрогени, подробно са изучени няколко гена.

CYP11A

Генът *CYP11A*, разположен в гърлото рамо на 15-та хромозома (15q24) кодира ензим, който е необходим в междинния етап на превръщане на холестерола в прогестерон – катализира превръщането на холестерола в прегненолон посредством отцепване на странична верига (*cytochrome P450 side chain cleavage enzyme*). Това е скорост-лимитираща реакция в превръщането на холестерола (55). В промоторния район е установен полиморфизъм (VNTR), който би могъл да играе важна роля в регулацията на генната експресия, вероятно посредством увеличаване скоростта на транскрипция. Ghahani et al. съобщава *CYP11A* генни вариации (полиморфизми) като предразполагащи фактори, в проучване на 97 безплодни жени (56). Други проучвания, включително в Гърция (57), потвърждават тези резултати и съобщават, че *CYP11A* е асоцииран с развитие на PCOS (58). За разлика от тях, проведено проучване във Великобритания не потвърждава тези резултати (52). Вероятно се касае за популационни различия.

Фигура 4. Повишен периферен кортизолов метаболизъм като възможен механизъм за развитие на PCOS.



CYP21

При синтеза на стероидни хормони превръщането на 17-хидроксипрогестерон в 11-дезоксикортизол се катализира от ензим (cytochrome P450c21, 21 α -hydroxylase), кодиран от гена CYP21. По-малко активен ензим поради генетична вариация води до неефективна стероидогенеза, което може да бъде причина за развитие на PCOS. Witchel и сътр. съобщават, че хетерозиготните носители на мутация в CYP21 могат да проявят PCOS-подобно заболяване с хиперандрогенемия (59). Около 33% от момичетата с преждевременно пубархе или хиперандрогенизъм в проучване на Arslanian и сътр. са хетерозиготни носители на мутации в CYP21 в сравнение с 6% от контролната популация (60). Подобна честота на хетерозиготно носителство на мутации в CYP21 се съобщава при жени и деца с хиперандрогенизъм в Англия, Франция, Испания и Гърция. Директна асоциация на вариации в CYP21 с PCOS, обаче, не е била установена при проучване, обхващащо 114 жени със синдрома (61).

CYP17

Превръщането на прегненолон и прогестерон в 17-хидроксипрегненолон и 17-хидроксипрогестерон се катализира от ензим (cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20 lyase), кодиран от гена CYP17, който се локализира в гълзото рамо на 10-та хромозома /10q24.3/. Този ензим включва едновременно 17 α хидроксилазна и 17,20-лиазна активност. В тека-клетките той превръща прогестерона в 17 α хидроксипрогестерон посредством 17 α хидроксилазната си активност и след това превръща 17 α хидроксипрогестерона в андростендион посредством 17,20 лиазната си активност. Изместването на отношението между двете ензимни активности в посока на 17 α хидроксилазната, е ключово в контрола на андрогенната биосинтеза и причина за нарушения в овариалната и надбъбречна андрогенна продукция. Серин фосфорилирането също участва

в пост-транслационната регулация на 17,20 лиазната активност и андрогенна секреция. Изучава се участието на сериновите остатъци, подлежащи на фосфорилиране, и киназата, осъществяваща този процес. Доказването на тази теория би обединило инсулиновата резистентност с PCOS.

Установен е генен полиморфизъм в регулаторния район на CYP17, асоцииран с повишаване на експресията на този ген, която предизвиква повишена синтеза на андрогени. Имайки предвид, че андрогените са с повишени нива при повечето жени с PCOS, проучванията показват, че PCOS може да бъде резултат от повишена функция на ензима. Wickenheisser и сътр. съобщават за повишена експресия на CYP17 в тека клетките и полиморфизъм в промоторната област на гена, свързан с PCOS (62). Скорошно проучване потвърждава повишен риск от изява на синдрома при носителство на полиморфизъм в CYP17 (63).

Ароматазен ген - CYP19

Генът CYP19, отговорен за P450 ароматазата, е свързан със синтеза на естроген и се намира в хромозомен район 15q21.2.73. Ароматазите са ензимен комплекс (цитохром P450arom), който катализира превръщането на C19 стероидите (андрогени) в C18 (естрогени). При лица с ароматазен дефицит е установен хиперандрогенизъм (51, 64). По-ниска ароматазна активност се отчита както при затлъстели, така и при слаби жени с PCOS (65).

2. Гени, свързани с ефектите на стероидните хормони

Андроген рецепторен (AR) ген

Биологичният ефект на андрогените се осъществява посредством андрогенния рецептор. Той принадлежи към групата на ядрените транскрипционни фактори и се кодира от ген в гълзото рамо на X хромозома /Xq11-12/, съставен от 11 екзони и кодиращ протеин с гължина 90 kb.

Съобщава се, че мутациите и структурните нарушения на гена причиняват PCOS. Инактивацията му води до нарушаване на клетъчния път, причинявайки повишаване на андрогенни хормони, водещо до PCOS. Тъй като AR генът е разположен върху X хромозомата, промяната в единично копие на гена е достатъчна, за да причини патология. Цялостно-геномните асоциативни проучвания (GWAS) също съобщават за AR генни промени като причина за PCOS (66).

Подобно на другите стероидни рецептори, AR има три функционални домена: лиганд /хормон/ свързващ участък, ДНК-свързващ участък и трансактивиращ участък. В последния участък генът има различен по гължина полиморфен район от CAG последователности, кодиращ полиглутаминова верига в N-терминалния трансактивиращ домен на AR (51,67, 68). Проучвания *in vitro* показват обратна връзка между гължината на CAG повторите и рецепторната активност, ето защо се очаква тази гължина да повлияе степента на чувствителност към андрогените (64). Hickey и сътр. сравняват X-инактивацията и гължината на CAG повтора при 83 фертилни и 122 стерилни жени с PCOS от бялата раса в Австралия. Те наблюдават по-голяма честота на повишени CAG повторите (>22) при стерилните жени с PCOS в сравнение с контролите или с общата популация и установяват преференциална експресия на X-хромозомата с по-гългите повтори в левкоцитите на жени с PCOS (69). Експресията за други тъкани е неизвестна. Други клинични проучвания подкрепят функционалната значимост на този район. Наскоро тази хипотеза получи нова подкрепа, поради установяване на връзка между късия CAG район и ниското серумно ниво на андрогените при ановулаторни пациентки. Патологичното му удължаване /над 40 повтори CAG/ предизвиква синдром на Kennedy, X-свързано заболяване със спинална и булбарна мускулна атрофия, асоциирана с различна степен на резистентност към андрогени. От друга страна, наличието на малък брой CAG повтори е свързано с повишен риск от рак на простатата и нисък риск от мъжки инфертилитет. Тъй като посочените резултати, макар и много интересни, не са окончателни и в някои отношения са противоречиви, необходими са повече изследвания за определяне на функционалното им значение (64).

Ген за свързващия половите хормони глобулин (Sex Hormone-Binding Globulin - SHBG)

Генът SHBG е локализиран в хромозомен район 17p13-p12 и синтезира протеин с 373 аминокиселини. Протеиновият продукт на SHBG контролира нивото на половите хормони в организма чрез свързване с андрогени, предимно тестостерон. Повечето продукти на SHBG се синтезират от хепатоцитите и синтезът се контролира от множество метаболитни фак-

тори, като инсулина. Концентрациите на SHBG са по-ниски при жените с PCOS, което се дължи главно на инхибиторен ефект на хиперинсулинемията върху синтеза на SHBG. Еднонуклеотиден полиморфизъм в гена SHBG е описан в редица проучвания като асоцииран с PCOS (70,71).

Ген DENND1A (Differentially Expressed in Normal and Neoplastic Development isoform A1)

С помощта на GWAS проучвания е намерен като потенциален рисков маркер за PCOS генът DENND1A. DENND1A кодира протеин (connecdenn 1), който образува ямки, покрити с клатрин, където са разположени повърхностно-клетъчните рецептори. Протеинът DENND1A се локализира в цитоплазмата и ядрата на тека-клетките. Този ген има 2 основни транскрипта: DENND1A вариант 1 (DENND1A.V1) и DENND1A вариант 2 (DENND1A.V2). Групата на McAllister показва, че протеинът DENND1A.V2 е по-експресиран в тека-клетките при PCOS в сравнение с нормални тека-клетки. Свърхекспресията на DENND1A.V2 в нормални тека-клетки *in vitro* води до повишаване експресията на CYP17A1 и CYP11A1 и повишена биосинтеза на андрогени, както в тека-клетките при PCOS, т.е. успява да възпроизведе PCOS фенотип (72). Освен това, генно заглушаване на DENND1A.V2 в тека-клетките при PCOS регулира експресията на CYP17A1 и CYP11A1 и биосинтезата на андрогени (44, 72). Открита е и експресия на DENND1A в зона reticularis на надбъбречната кора (73). Предвид всички тези данни, DENND1A.V2 е потенциално един от механизмите, свързани с интринзич дефектите на стероидогенезата в овариалните тека-клетки при PCOS.

3. Гени, участващи в действието и регулацията на гонадотропините

Ген за Лутеинизиращ хормон (LH) и неговия рецептор

Както повишените нива на LH, откриващи се в около 40% от жените с PCOS, така и нарушената му функция с резултат ановулация могат да участват в развитието на PCOS (74). Високото ниво на LH може да засилва производството на андрогени. Отрицателната обратна връзка в отговор на повишения LH води до намаление на фоликулостимулиращия хормон (FSH), играещ индиректна роля в резултат на намаленото превръщане на андрогени в естрогени, което стимулира производството на андрогени в яйчиците (75).

Установени са два молекулни варианта на LH. Единият е резултат на 2 точкови мутации във втори екзон на гена за β -субединицата, причиняващи структурни промени в LH молекулата. Този генетичен полиморфизъм е с честота около 18,5%, като най-висока честота се установява в Северна Европа и най-ниска в Азия. В сравнение с дивия тип LH, този генетичен вариант има по-висока биологична активност *in vitro*, но по-къс по-

луживот *in vivo*. Някои автори установяват асоциация между този генетичен вариант и повишените серумни нива на тестостерона. Други проучвания не потвърждават подобна връзка. Другият LH вариант е резултат на една missense мутация в трети екзон на β -субединицата и се установява в около 4% от инфертилните жени. Не е установено физиологичното и патофизиологично значение на този генетичен вариант, чиято роля в менструалните нарушения и женска инфертилност е твърде вероятна (64).

Генът, кодиращ както LH, така и неговия рецептор, е изследван при PCOS, за да се открие възможна асоциация (76). Първоначално се съобщава за точкови мутации (Trp8Arg и Ilg15Thr) в гена, кодиращ α -субединицата на LH при жени с PCOS (77). Обаче, същата мутация е съобщена като непатогенна и се среща при 15% от нормалната популация (78).

Ген за Рецептора на фоликуло-стимулиращия хормон (FSHR)

Генът за FSHR е локализиран в късото рамо на хромозома 2 и се състои от 14 екзони. Генът кодира G-свързан рецептор, който е необходим за развитието на половите жлези. Мутации в гена нарушават структурния протеин, като по този начин причиняват хормонален дисбаланс, индуциращ развитие на PCOS. Асоциативните анализи показват връзка на някои полиморфизми със синдрома (79). Но според по-отдавнашни проучвания полиморфизмът на FSH-рецепторния ген при PCOS няма патофизиологична значимост по отношение на яйчниковата функция (80).

При жени с PCOS не са открити мутации на GnRH- рецепторния ген (81).

Ген за Антимюлеров хормон (AMH)

Генът за AMH е разположен в дългото рамо на хромозома 19 в хромозомен район 19q13.3. Генът се състои от пет екзони и кодира протеин, който е свързан с инфертилитета. Вариации в гена AMH се асоциират с PCOS. Цялостно екзомно секвениране и GWAS набелязват няколко варианта в гена AMH като силни предиктори за PCOS (82).

Ген за фолиостатин

Фолиостатинът е свързващият протеин на активина, неутрализиращ биологичната му активност *in vivo* и *in vitro*. Активин и фолиостатин се експресират в яйчиците, надбъбречната кора, хипофизата и панкреаса. Активинът стимулира овариалната фоликулогенеза, потиска андрогенната продукция, повишава FSH и инсулиновата секреция. Повишената активност на фолиостатина предизвиква противоположни ефекти и фенотип, сходен с PCOS (83). Urbanek и сътр. в проучването си върху кандидат гените за PCOS установяват статистически достоверно участие на маркер близо до гена за фолиостатин със синдрома (51). Секвенирането на фо-

лиостатиновия ген, обаче, не е показало асоциация на алелните варианти с PCOS (84).

4. Гени, участващи в инсулиновото действие и секреция

Инсулинов ген

Установеното нарушение в първата фаза на инсулинова секреция при пациентки с PCOS, доведе до проучване на инсулиновия ген. Инсулинът играе съществена роля в производството на андрогени чрез рецепторите, присъстващи в тека клетките. Това действие на инсулина се провокира от молекулярния път фосфоинозитид 3-киназа/протеин киназа B, който става активен в тека клетките при PCOS (85). Подобно на LH, високото ниво на инсулин също стимулира синтеза на андрогени (86).

Генът *INS* се локализира в късото рамо на 11 хромозома /11p15.5/ между гените за инсулин-растежен фактор-II /IGF-II/ и гена за тирозин-хидроксилаза. До 5' края на инсулиновия ген е локализиран минисателит /*INS VNTR-insulin gene variable number of tandem repeats*/, който директно участва в регулацията на инсулиновото действие. Това е силно полиморфен район, изграден от тандемно повтарящи се 14-15 базови двойки. Броят на повторенията варира от 26 до 200. По този критерий-размер на *INS VNTR* са оформени три класа алели: клас I са най-къси с 26-63 повтори, клас II алелите, редки при Европейската раса са със средна дължина 80 повтори, и клас III са най-дългите – 141-209 повтори. Полиморфизмът на *INS VNTR* е функционален, тъй като регулира транскрипцията на инсулиновия ген и вероятно – експресията на IGF-I. Установено е, че инсулинов промотер с дълъг *INS VNTR* алел има по-висока транскрипционна активност от късия алел. Нещо повече, *INS VNTR* може да се свързва с няколко транскрипционни фактора, като Pur-1, който увеличава базалната транскрипция от инсулиновия промотор дори и в клетки, които нормално не експресират този ген. Клас III алелите на *INS VNTR* се асоциират с инсулинова резистентност и хипертриглицеридемия, висцерален obezitet и повишено тегло на новороденото.

Мета анализ на хомозиготи по *INS VNTR* клас III потвърждава връзката със ЗД тип 2, а хомозиготност по клас I алели – със ЗД тип I. Waterworth и сътр. доказаха асоциация между PCOS /най-вече ановулаторния/ с хомозиготността по клас III *INS VNTR*. Жените с един или два алела от клас III, имат значимо по-високи стойности на инсулин на гладно и по-висок ИТМ в сравнение с жените с генотип I/I. Тези данни обясняват високата честота на инсулинова резистентност и хиперинсулинемия при жени с поликистоза на яйчиците и ановулаторни цикли в сравнение с пациентки с хиперандрогенемия и редовен менструален цикъл. В 60% от членовете на 17 семейства на жени с PCOS и мъжки тип оплешивяване от три

различни етнически популации се открива връзка на нарушенията с клас III алелите на INS VNTR (хемозиготен III/III генотип). Клас III алели са най-силно свързани с ановуляторен PCOS. Установява се сигнификантно по-често предаване на клас III алелите от бащата, отколкото от майката (87). Тази положителна връзка между унаследените по бащина линия клас III алели се потвърждава от Michelmore и сътр. (88).

Сравнително проучване в Испания от Calvo и сътр. не намира връзка между VNTR полиморфизма в инсулиновия ген и наличието на хиперандрогенизъм (89). Такива са и заключенията на Urbanek и сътр. при голяма извадка от 150 фамилии (51, 90). Възможна причина за противоречивите резултати могат да бъдат различните методи на генотипизиране на VNTR (директно определяне размера на INS VNTR спрямо използване на тясно скачен единичен нуклеотиден полиморфизъм като маркер за VNTR), както и разлики във фенотипните характеристики на пациентките в отделните проучвания.

Ген за инсулиновия рецептор INSR

Този ген кодира протеин, съставен от две алфа и две бета вериги (91). Проведени са няколко проучвания за установяване на връзката му с безплодието при затлъстели жени с PCOS, но не е била открита такава. Изследван е тирозин киназният домейн-кодиращ регион на INSR при жени с PCOS (92). Сканиран е целия ген при носителки на синдрома в проучване на Diamanti-Kandarakis и сътр. (93). Нито едно от тези проучвания не установява връзка между PCOS и INSR. Асоциативно проучване на по-голяма част от хромозома 19p13.2 съобщава, че най-силната асоциация със синдрома е на фрагмент D19S884, съдържащ и гена INSR (94).

Гени за инсулин рецепторни субстратни протеини

След свързване на инсулина с неговия рецептор, активираният рецептор се автофосфорилира. Впоследствие тирозин киназната активност на INS рецептора фосфорилира IRS-1 и IRS-2. Тези активирани субстрати се използват в процеса надолу по веригата. Извършени са няколко проучвания, за да се установи ролята на гените за IRS-1 и IRS-2 при PCOS. Sir-Petermann и сътр. съобщават за по-висока честота на Arg972 варианта в IRS-1 при жени с PCOS (95), докато El Mkaed и сътр. не съобщават за значима разлика между споменатия генетичен вариант при носителки на синдрома и контроли (96). Dilek и сътр. докладват за много по-висока честота на Gly972Arg в IRS-1 при жени с PCOS в Турция (97). Докладвани са както наличие на асоциация, така и никаква асоциация за тези гени. Това подчертава значителните географски и етнически разлики.

Ген за Калпаин 10

Генът за CAPN10 е локализиран в дългото

рамо на хромозома 2 и съдържа 12 екзони. Той кодира зависима от калций цистеинова протеаза, представляваща хетеродимерен протеин. Известно е, че калпаин-10 възпрепятства секрецията и метаболизма на инсулина, асоцииран е със ЗД тип 2, поради което генът също е изследван като възможен кандидат ген за PCOS. Изказано е предположение, че мутации в CAPN10 също могат да причинят PCOS (98).

В по-ранни проучвания Ehrmann и сътр. (99) тестват жени с PCOS (124 от европейски произход и 57 афроамериканки) за връзка между халлотипове на гена, асоциирани със ЗД тип 2 и серия фенотипни характеристики на PCOS. Такава връзка при жените с PCOS от европейски произход не е намерена, но при популацията афроамериканки съчетанието на халлотипове 112 и 121 (диплотипът 112/121) е сигнификантно асоцииран с повишени инсулинови нива в хода на орален глюкозотолерантен тест (oГТТ) (99). В друго проучване при 331 жени, обаче, Haddad и сътр. не потвърждават наличието на такава зависимост (100).

Други гени

Ген за мастно затлъстяване (FTO)

Генът FTO (Fat Mass Obesity) кодира ензима алфа-кетоглутарат-зависима диоксигеназа и е локализиран в дългото рамо на хромозома 16. Генът се съобщава за асоцииран със затлъстяване и ЗД тип 2 (101). В едно проучване на жени с PCOS в Пакистан, е докладвана значима асоциация на SNP rs9939609 в гена със заболяването. Честотата на SNP rs9939609 е била сигнификантно по-висока при засегнати жени в сравнение със здрави контроли (102).

Ген за лептин

Лептинът, продукт на гена на затлъстяването (ob gene), корелира положително с ИТМ и варира в зависимост от менструалния цикъл, нивото на прогестерона и е най-висок в лутеалната фаза. Тези данни показват регулаторната роля на лептина за овариалната функция. Лептинът играе есенциална роля в патологичните процеси при PCOS. Обезните жени с PCOS имат по-високи нива на лептин и свободен лептинов индекс в сравнение със слабите. PCOS се характеризира с повишен свободен лептинов индекс и намаление на лептиновите рецептори. Липсват, обаче, данни за мутации в гена за лептин или лептин-рецептор при жени с PCOS (103).

Ген PCOS1

Цитогенетичното разположение на гена PCOS1 е в 19p13.2. Генът е асоцииран с PCOS в няколко проучвания. Генът е известен още като PCO и всъщност е докладван като предразполагащ регион от хромозома 19. Първоначално той е идентифициран при две сестри през 1971 г. По-късно изследването е репликирано през 2005 г. от Urbanek и сътр. (94).

Гени SRD5A2 и SRD5A1

Цитогенетичното разположение на SRD5A2 е 2p23.1. Повишена активност на SRD5A сред жени с PCOS в сравнение с незасегнати жени е докладвана през 1999 г. от Jakimiuk и сътр. (104). По-късно през 2006 г. SRD5A2 и SRD5A1 са тествани като гени на предразположеност към PCOS при пациентки с хирзутизъм и е съобщено, че вариант в SRD5A2 гена е протективен за PCOS, докато варианти в SRD5A1 гена са свързани с риск от хирзутизъм и съответно PCOS (105).

5. Епигенетика и PCOS

Наследствените промени в генната експресия, които не се дължат на промяна в последователността на ДНК, но които са митотично унаследяеми, са известни като епигенетични промени. Съобщава се за участие на епигенетични промени при много заболявания, като ЗД тип 2 (106), PCOS (107) и рак на простатата (108). Намерено е, че по-високата секреция на андрогени във феталното развитие причинява заболявания при плъхове, маймуни, и овце (109). Симптомите на заболяванията са подобни на PCOS. Въпреки че има етични ограничения при изследванията с хора, някои проучвания показват, че повишеното ниво на андрогени през феталния период предразполага потомството към PCOS-подобни симптоми в по-късните етапи от живота.

Qi и сътр. съобщават за нарушено ДНК метилиране в промоторите на гените PPARG1 и NCOR1 в гранулозните клетки, което причинява развитието на яйчниковата дисфункция (110).

Zhao и сътр. (111) проучват критично дълги некодиращи РНК (lncRNAs), които биха могли да играят основна роля в инсулиновата резистентност – IRLMN. Нивото на експресия на lncRNA RP11-151A6.4 в яйчникови гранулоза-клетки е повишено при жени с PCOS в сравнение с контроли. Нивата са по-високи при жени с PCOS с по-висок ИТМ, хиперинсулинемия и повишен HOMA-IR. RP11-151A6.4 вероятно има жизнено важна роля при инсулинова резистентност, излишък на андрогени и мастна дисфункция (111).

Това епигенетично участие при PCOS още повече подчертава сложността на заболяването.

В заключение, големият напредък в развитието на генетиката и данните от съвременните генетични изследвания, в съчетание с епигенетични и многобройни клинични проучвания при PCOS допринасят за разгадаване етиологията на това сложно и хетерогенно заболяване с благоприятни последици за клиничната практика. Определянето на генетични маркери може да подобри диагнозата на синдрома и неговите фенотипни прояви, което да позволи ранна намеса при асоциирани ко-морбидности и адекватно индивидуализирано лечение.

References

1. Dunaif A, Thomas A. Current concepts in the polycystic ovary syndrome. *Annu Rev Med* 2001; 52: 401-419.
2. Kolarov G, Orbetzova M. Polycystic Ovary Syndrome. Sofia: Viara; 2004. ISBN 954-9409-01-5; 232 pp. (in Bulgarian) [Коларов Г, Орбетцова М. Поликистозен овариален синдром. ИК „Виара“, София 2004].
3. Cheung AP, Cog F. Polycystic ovary syndrome: a contemporary view. *J Obstet Gynaecol Can* 2010; 32: 423-425.
4. Orbetzova M. Contemporary review and treatment of polycystic ovary syndrome. *Medinfo* 2021; 1: (In Bulgarian) [Орбетцова М. Съвременен преглед и лечение на поликистозния овариален синдром. *Мединфо* 2021; 1:].
5. Stein IF, ML Leventhal. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1935; 29:181-186.
6. Solomon CG. The epidemiology of polycystic ovary syndrome. Prevalence and associated disease risks. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28 (2):247-263.
7. Kamenov Z, Orbetzova M, Gateva A. Polycystic Ovary Syndrome. Sofia: ZIP Ltd.; 2010; 258 p. ISBN 978-954-9369-17-5 (in Bulgarian) [Каменов З, Орбетцова М, Гатева А. Синдром на поликистозните яйчници. ИК „Зип“ ЕООД, София 2010, 258 стр. ISBN 978-954-9369-17-5].
8. Sirmans SM, Pate KA. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Epidemiol* 2014; 6: 1-13.
9. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DJ, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010; 25: 544-551.
10. Yildiz BO, Bozdag G, Yapici Z, Esinler I, Yarali H. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2012; 27: 3067-3073.
11. Conn JJ, Jacobs HS, Conway GS. The prevalence of polycystic ovaries in women with type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol* 2000; 52: 81-86.
12. Allahabadi GN, Merchant R. Polycystic ovary syndrome in the Indian subcontinent. *Semin Reprod Med* 2008; 26: 22-34.
13. Jalilian A, Kiani F, Sayehmiri F, Sayehmiri K, Khodae Z, Akbari M. Prevalence of polycystic ovary syndrome and its associated complications in Iranian women: A meta-analysis. *Iran J Reprod Med* 2015; 13: 591-604.
14. Rotterdam ESHRE-ASRM Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2004; 19: 41-47.
15. Balen AH, Laven JS, Tan SL, Franks S, Legro RS, Wijayaratne CN, et al. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 505-514.
16. Pehlivanov B, Orbetzova M. Characteristics of different phenotypes of polycystic ovary syndrome in a Bulgarian population. *Gynecol Endocrinol* 2007; 23 (10): 604-609.
17. Orbetzova MM. Clinical Impact of Insulin Resistance in Women with Polycystic Ovary Syndrome. In „Polycystic ovarian syndrome“ ed. Zhengchao Wang, *InTech*, 2020; pp 17-46.
18. Carmina E, Campagna AM, Lobo RA. A 20-year follow-up of young women with polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 2012; 119 (2, Pt 1): 263-269.
19. Pasquali R, Gambineri A, Anconetani B, Vicennati V, Colitta D, Caramelli E, et al. The natural history of the metabolic syndrome in young women with the polycystic ovary syndrome and the effect of long-term oestrogen-progestagen treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; 50(4): 517-527.

20. **Orbetzova M.** Polycystic ovary syndrome. In: Vlaskovska M, Tankova T, Popova D, Georgiev B, editors. Prophylaxis, Diagnostics, Therapy - Current Problems 2012. Sofia: Havitis; 2012. pp. 407-434. ISBN: 978-954-92936-1-6 (in Bulgarian) [**Орбецова М.** Синдром на поликистозните яйчници. В „Профилактика, диагностика, терапия – актуални проблеми, 2012“. Издател „Хавитис“ ООД, Рег. М. Власковска, Ц. Танкова, Д. Попова, Б. Георгиев; София 2012; стр. 407-434. ISBN: 978-954-92936-1-6]
21. **Balen A.** Pathogenesis of polycystic ovary syndrome - the enigma unravels? *Lancet* 1999; 354 : 967-968.
22. **Strauss III JF.** Thoughts on the pathophysiology and genetics of polycystic ovary syndrome. *Ann NY Acad Sci* 2003; 997:42–48.
23. **Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS.** The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 2004; 60(1): 1-17.
24. **Orbetzova M.** Cardiovascular risk, subclinical and clinically overt cardiovascular diseases in polycystic ovary syndrome. In Prevention, Diagnosis, Treatment – Current Problems, 2018; eds. M. Vlaskovska, M. Orbetzova, B. Georgiev, G. Momekov, L. Kirov. Sofia Havitis; pp.445-485. ISBN:978-954-92936-0-9 (In Bulgarian) [**Орбецова М.** Сърдечно-съдов риск, субклинични и клинично-изявени ССЗ при синдром на поликистозните яйчници. В „Профилактика, диагностика, терапия – актуални проблеми, 2012“. Издател „Арбулис“ ООД стр. 445-485. ISBN:978-954-92936-0-9].
25. **Book C, Dinaif A.** Selective insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3110-3116.
26. **Rosen E, Spiegelman B.** Tumor necrosis factor- α as a mediator of insulin resistance of obesity. *Curr Op Endocr Diab* 1999; 6: 170-176.
27. **Bergh C, Carisson B, Olsson J, Selleskog U, Hillenjo T.** Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor I and insulin. *Fertil Steril* 1993; 59: 323-331.
28. **Siddle K, Soos M, Field C, Nave B.** Hybrid and atypical insulin/insulin-like growth factor I receptors. *Horm res* 1994; 41: 56-64.
29. **Willis D, Franks S.** Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *J Clin Endocr Metab* 1995; 80: 3788-3790.
30. **Adashi EY.** Hypothalamic-pituitary dysfunction in polycystic ovarian disease. *Endocrinol Metab Clinics North Am* 1988; 17: 649-666.
31. **Venturoli S, Porcu E, Fabbri R, Magrini O, Gammi L, Paradisi R, et al.** Episodic pulsatile secretion of FSH, LH, prolactin, oestradiol, oestrone, and LH circadian variations in polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1988; 28: 93-107.
32. **Berga SL, Yen SS.** Opioidergic regulation of LH pulsatility in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1989; 30: 177-184.
33. **Odunsi K, Kidd KK.** A paradigm for finding genes for a complex human trait: polycystic ovary syndrome and follistatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(15): 8315-8317.
34. **Cataldo NA, Giudice LC.** Follicular fluid insulin-like growth factor binding protein profiles in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 695-697.
35. **Conway GS, Jacobs HS, Holly JM, Wass JA.** Effects of luteinizing hormone, insulin, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor small binding protein 1 in the polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1990; 33: 593-603.
36. **Bedenk J, Vrtačnik-Bokal E, Virant-Klun I.** The role of anti-Müllerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility. *J Assist Reprod Genet* 2020; 37(1): 89-100.
37. **Silva MSB, Giacobini P.** New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and neuroendocrine development. *Cell Mol Life Sci* 2021; 78: 1–16.
38. **Jamil Z, Fatima SS, Ahmed K and Malik R.** Anti-Müllerian Hormone: Above and Beyond Conventional Ovarian Reserve Markers. *Disease Markers* 2016; 2016:524621.
39. **Oh SR, Choe SY, Cho YJ.** Clinical application of serum anti-Müllerian hormone in women. *Clin Exp Reprod Med* 2019; 46(2): 50-59.
40. **Ilieva M, Orbetzova M.** Anti-Müllerian Hormone in Women with Diabetes Mellitus Type 1. *Endocrinologia* 2021; 1: 17-23. (In Bulgarian) [**Илиева М, Орбецова М.** Антимюлеров хормон при жени със захарен диабет тип 1. *Ендокринология* 2021; 1: 17-23].
41. **Abbara A, Eng PC, Phylactou M, Clarke SA, Hunjan T, Roberts R, et al.** Anti-Müllerian hormone (AMH) in the Diagnosis of Menstrual Disturbance Due to Polycystic Ovarian Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; 10: 656.
42. **Cimino I, Casoni F, Liu X, Messina A, Parkash J, Jamin SP, et al.** Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nat Commun* 2016; 7(1): 1-2.
43. **Wang F, Niu W, Kong H, Guo YH, Sun Y.** The role of AMH and its receptor SNP in the pathogenesis of PCOS. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 439: 363-368.
44. **Rosenfield RL, Ehrmann DA.** The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocrine Reviews* 2016; 37(5): 467–520.
45. **Gonzalez F, DA Hatala, L Speroff.** Adrenal and ovarian steroid hormone responses to gonadotropin-releasing hormone agonist treatment in polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 535-545.
46. **McKenna TJ, U Fearon, D Clarke, SK Cunningham.** A critical review of the origin and control of adrenal androgens. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1997; 11: 229-248.
47. **Khan MJ, Ullah A, Basit S.** Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Current Perspectives. *Appl Clin Genet* 2019; 12: 249-260.
48. **Kosova G, Urbanek M.** Genetics of the polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2013 5; 373(1-2): 29-38.
49. **Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI.** Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(6): 2100-2104.
50. **Boomsma DI, Busjahn A, Peltonen L.** Classical twin studies and beyond. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 872–882.
51. **Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, Azziz R, Ehrman DA, Norman RJ, et al.** Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8573–8578.
52. **Gaasenbeek M, Powell BL, Sovio U, Haddad L, Gharani N, Bennett A, et al.** Large-scale analysis of the relationship between CYP11A promoter variation, polycystic ovarian syndrome, and serum testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2408–2413.
53. **Franks S, McCarthy M.** Genetics of ovarian disorders: polycystic ovary syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 2004; 5: 69–76.
54. **Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R.** Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nature Rev Endocrinol* 2011; 7: 219–231.
55. **Franks S, Gilling-Smith C, Gharani N, McCarthy M.** Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: evidence for a genetically determined disorder of ovarian androgen production. *Hum Fertil* 2000; 3: 77–79.
56. **Gharani N, Waterworth DM, Batty S, White D, Gilling-Smith C, Conway GS, et al.** Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 397–402.
57. **Diamanti-Kandaraki E, Kouli C, Bergiele A, Filandra F, Tsaneteli C, Spina G.** A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4006-4011.
58. **Wang Y, Wu XK, Cao Y, Yi L, Chen J.** A microsatellite polymorphism (tttta)n in the promoter of the CYP11a gene in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006; 86: 223–226.
59. **Witchel SF, Aston CE.** The role of heterozygosity for CYP21 in the polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; 13: 1315–1317.
60. **Arslanian SA, Witchel SF.** Polycystic ovary syndrome in adolescents: is there an epidemic? *Growth and development* 2002; 9(1): 32-42.
61. **Witchel SF, Kahsar-Miller M, Aston CE, White C, Azziz R.** Prevalence of CYP21 mutations and IRS1 variant among women with polycystic ovary syndrome and adrenal androgen excess. *Fertil Steril* 2005; 83: 371–375.
62. **Wickenheiser JK, Quinn PG, Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, McAllister JM.** Differential activity of the cytochrome P450 17 α -hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2304–2311.
63. **Rahimi Z, Mohammadi M Sc E.** The CYP17 MSP AI (T-34C) and CYP19A1 (Trp39Arg) variants in polycystic ovary syndrome: A case-control study. *Int J Reprod Biomed* 2019; 17(3): 201–208.
64. **Atanasova I, Orbetzova M, Kolarov G.** Genetics of the polycystic ovary syndrome. *Endocrinologia* 2005; 2005; 3: 138-148.

- (In Bulgarian) [Атанасова И, Орбецова М, Коларов Г. Генетика на поликистозния овариален синдром /PCOS/. *Ендокринология* 2005; 3: 138-148].
65. **Bulun SE, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Yilmaz B, Sebastian S.** Organization of the human aromatase p450 (CYP19) gene. *Semin Reprod Med* 2004; 22(1): 5-9.
 66. **Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M.** The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat* 2012; 33: 887-894.
 67. **Mifsud A, Ramirez S, Yong EL.** Androgen receptor gene CAG trinucleotide repeats in anovulatory infertility and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3484-3488.
 68. **Witchel SF, R Smith, M Tomboc, Aston CE.** Candidate gene analysis in premature pubarche and adolescent hyperandrogenism. *Fertil Steril* 2001; 75: 724-730.
 69. **Hickey T, Chandry A, Norman RJ.** The androgen receptor CAG repeat polymorphism and X-chromosome inactivation in Australian Caucasian women with infertility related to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 161-165.
 70. **Wickham EP, Ewens KG, Legro RS, Dunaif A, Nestler JE, Strauss JF.** Polymorphisms in the SHBG gene influence serum SHBG levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: E719-E727.
 71. **Chen C, Smothers J, Lange A, Nestler JE, Strauss Iii JF, Wickham Iii EP.** Sex hormone-binding globulin genetic variation: associations with type 2 diabetes mellitus and polycystic ovary syndrome. *Minerva Endocrinol* 2010; 35(4): 271-280.
 72. **McAllister JM, Modi B, Miller BA, Biegler J, Bruggeman R, Legro RS, et al.** Overexpression of a DENND1A isoform produces a polycystic ovary syndrome theca phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(15): E1519-1527.
 73. **McAllister JM, Legro RS, Modi BP, Strauss JF.** Functional genomics of PCOS: from GWAS to molecular mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 2015; 26(3): 118-124.
 74. **Franks S, Stark J, Hardy K.** Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 539.
 75. **Nardo LG, Patchava S, Laing I.** Polycystic ovary syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Panminerva Med* 2008; 50: 267-278.
 76. **Tapanainen JS, R Koivunen, BC Fauser, Taylor AE, Clayton RN, Rajkova M, et al.** A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1711-1715.
 77. **Furui K, Suganuma N, Tsukahara SI, Asada Y, Kikkawa F, Tanaka M, et al.** Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) β -subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 107-113.
 78. **Nilsson C, Matzuk MM, Petterson K, Coerver KA, Matzuk MM, Huhtaniemi IT.** Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. *Fertil Steril* 1997; 67: 998-1004.
 79. **Gromoll J, Simoni M.** Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 368-373.
 80. **Conway GS, E Conway, C Walker, Hoppner W, Gromoll J, Simoni M.** Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; 51(1): 97-99.
 81. **Cohen DP, EM Stein, Z Li, Matulis CK, Ehrmann DA, Layman LC.** Molecular analysis of the gonadotropin-releasing hormone receptor in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1999; 72(2): 360-363.
 82. **Gorsic LK, Kosova G, Werstein B, Sisk R, Legro RS, Hayes MG, et al.** Pathogenic anti-Müllerian hormone variants in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102: 2862-2872.
 83. **Norman RJ, Milner CR, Groome NP, Coerver KA, Matzuk MM, Huhtaniemi IT.** Circulating follistatin concentrations are higher and activin concentrations are lower in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2001; 16: 668-672.
 84. **Calvo RM, Villuendas G, Sancho J, San Millán JL, Escobar-Morreale HF.** Role of the follistatin gene in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001; 75:1020-1023.
 85. **Munir I, Yen H-W, Geller DH, Torbati D, Bierden RM, Weitsman SR, et al.** Insulin augmentation of 17 α -Hydroxylase activity is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase but not extracellular-signal-regulated kinase-1/2 in human ovarian theca cells. *Endocrinology* 2004; 145: 175-183.
 86. **Baillargeon J-P, Carpentier A.** Role of insulin in the hyperandrogenemia of lean women with polycystic ovary syndrome and normal insulin sensitivity. *Fertil Steril* 2007; 88: 886-893.
 87. **Waterworth DM, Bennett ST, Gharani N, McCarthy MI, Hague S, Batty S, et al.** Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet* 1997; 349: 986-990.
 88. **Michelmores K, Ong K, Mason S, Bennett S, Perry L, Vessey M, et al.** Clinical features in women with polycystic ovaries: relationships to insulin sensitivity, insulin gene VNTR and birth weight. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 55: 439-446.
 89. **Calvo RM, D Telleria, J Sancho, San Millán JL, Escobar-Morreale HF.** Insulin gene variable number of tandem repeats regulatory polymorphism is not associated with hyperandrogenism in Spanish women. *Fertil Steril* 2002; 77: 666-668.
 90. **Urbanek M, Legro RS, Driscoll D, Strauss JF 3rd, Dunaif A, Spielman RS.** Searching for the polycystic ovary syndrome genes. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; 13:1311-1313.
 91. **Signaling T, Goldfine IRAD.** The insulin receptor: molecular biology and transmembrane signaling. *Endocrine Rev* 2015; 8: 3.
 92. **Kashima K, Yahata T, Fujita K, Tanaka K.** Polycystic ovary syndrome: association of a C/T Single nucleotide polymorphism at tyrosine kinase domain of insulin receptor gene with pathogenesis among lean Japanese women. *J Reprod Med* 2013; 58: 491-496.
 93. **Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG.** Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends Mol Med* 2006; 12: 324-332.
 94. **Urbanek M, Woodroffe A, Ewens KG, Diamanti-Kandarakis E, Legro RS, Strauss JF 3rd, et al.** Candidate gene region for polycystic ovary syndrome on chromosome 19p13.2. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(12): 6623-6629.
 95. **Sir-Petermann T, Pérez-Bravo F, Angel B, Maliqueo M, Calvillan M, Palomino A.** G972R polymorphism of IRS-1 in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetologia* 2001; 44: 1200-1201.
 96. **El Mkaadem SA, Lautier C, Macari F, Molinari N, Lefebvre P, Renard E, et al.** Role of allelic variants Gly972Arg of IRS-1 and Gly1057Asp of IRS-2 in moderate-to-severe insulin resistance of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 2164-2168.
 97. **Dilek S, Ertunc D, Tok EC, Erdal EM, Aktas A.** Association of Gly972Arg variant of insulin receptor substrate-1 with metabolic features in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2005; 84: 407-412.
 98. **Ajmal N, Khan SZ, Shaikh R.** Polycystic ovary syndrome (PCOS) and genetic predisposition: A review article. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X* 2019; 3: 100060.
 99. **Ehrmann DA, PE Schwarz, M Hara, Tang X, Horikawa Y, Imperial J, et al.** Relation of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1669-1673.
 100. **Haddad L, Evans JC, Gharani N, Robertson C, Rush K, Wiltshire S, et al.** Variation within the Type 2 Diabetes Susceptibility Gene Calpain-10 and Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2 606-2610.
 101. **Wojciechowski P, Lipowska A, Rys P, Ewens KG, Franks S, Tan S, et al.** Impact of FTO genotypes on BMI and weight in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 2012; 55: 2636-2645.
 102. **Rizwan S, Ghazanvi S, Rasheed N, Mi U.** Association of FTO common RS9939609 polymorphism with obesity and association of FTO common RS9939609 polymorphism with obesity and polycystic ovarian syndrome in Pakistani women. *J Med Res Biol Stud* 2018; 1(1): 1-5.
 103. **Oksanen L, Titinen A, Kaprio J, Koistinen H, Karonen S, Kontula K.** No evidence for mutations of the leptin or leptin receptor genes in women with polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 873-876.
 104. **Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Magoffin DA.** 5 α -Reductase activity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2414-2418.

105. **Goodarzi MO, Shah NA, Antoine HJ, Pall M, Guo X, Azziz R.** Variants in the 5- α -reductase type 1 and type 2 genes are associated with polycystic ovary syndrome and the severity of hirsutism in affected women *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4085–4091.

106. **Martin-Gronert MS, Ozanne SE.** Programming of appetite and type 2 diabetes. *Early Hum Dev* 2005; 81: 981–988.

107. **Xu N, Azziz R, Goodarzi MO.** Epigenetics in polycystic ovary syndrome: a pilot study of global DNA methylation. *Fertil Steril* 2010; 94: 781–783.

108. **Ho SM, Tang WY, Belmonte De Frausto J, Prins GS.** Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res* 2006; 66: 5624–5632.

109. **Wang F, Yu B, Yang W, Liu J, Lu J, Xia X.** Polycystic ovary syndrome resembling histopathological alterations in ovaries from prenatal androgenized female rats. *J Ovarian Res* 2012; 5: 15.

110. **Qu F, Wang FF, Yin R, Ding GL, El-Prince M, Gao Q, et al.** A molecular mechanism underlying ovarian dysfunction of polycystic ovary syndrome: hyperandrogenism induces epigenetic alterations in the granulosa cells. *J Mol Med* 2012; 90: 911–923.

111. **Zhao J, Huang J, Geng X, Chu W, Li S, Chen ZJ, Du Y.** Polycystic Ovary Syndrome: Novel and Hub lncRNAs in the Insulin Resistance-Associated lncRNA-mRNA Network. *Front Genet* 2019; 10: 772.

Address for correspondence:

● **Проф. д-р Иванка Димова,**

Лаборатория по геномна диагностика, Център по молекулярна медицина, МУ София, Ул. „Здраве“ 2, СБАЛАГ „Майчин дом“, 14^{та} ет. София 1431
e-mail: ivanka.i.dimova@gmail.com

● **Prof. Dr. Ivanka Dimova,**

● Clinic of Endocrinology and metabolic diseases, Laboratory of Genomic Diagnostics, Center for Molecular Medicine, Medical University of Sofia
● 2, „Zdrave,“ Str., UMHAT „Maichin Dom“, 14th floor, Sofia 1431
● e-mail: ivanka.i.dimova@gmail.com

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

Серумни нива на киспептин 10 и ендостатин при лица със затлъстяване и нарушения във въглехидратната обмяна

Недева, Ивета С.¹, Гатева, Антоанета Т.¹, Асьов, Явор С.¹, Карамфилова, Вера Н.¹, Великова, Цветелина В.², Каменов, Здравко А.¹

¹ Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Александровска“, Катедра Вътрешни болести, Медицински Факултет, Медицински Университет, София

² Клинична имунология, Университетска болница „Лозенец“, София

Адрес за кореспонденция:

Д-р Ивета Недева,
Клиника по Ендокринология и болести на обмяната,
УМБАЛ „Александровска“,
ул. „Георги Софийски“, 1, 1431 София, България
e-mail: iveta_nedeva@yahoo.com

Постъпване: 29. 06. 2021г.

Приемане: 29. 08. 2021г.

Резюме

Ендостатин, фрагмент на колаген XVIII, представлява обещаващ маркер за сърдечно-съдова увреда. Киспептинът има важна роля в репродуктивната регулация, глюкозната хомеостаза, хранителния прием и телесния състав.

Цел: Да се сравнят серумните нива на ендостатин и киспептин 10 като маркери за ендотелна дисфункция при лица със затлъстяване без гликемични нарушения, такива с предиабет и новодиагностициран захарен диабет, както и да се оцени връзката им с някои инструментални показатели за микро- и макросъдови увреждания.

Материали и методи: Изследвани бяха общо 163 лица на средна възраст $52,45 \pm 11,27$ г., разпределени в следните основни групи:

Група 1 – лица със затлъстяване без въглехидратни нарушения;

Група 2 – лица с предиабет и Група 3 – лица с новодиагностициран захарен диабет. Контролната група включваше 42 здрави лица. Серумните нива на киспептин-10 и ендостатин са изследвани чрез ELISA метод.

Резултати: Не се установи разлика в нивата на киспептин-10 и ендостатин между изследваните патологични групи. Нивата на киспептин-10 са по-ниски при лицата с метаболитен синдром и тези с артериална хипертония спрямо тези без съответните нарушения. Позитивна връзка се констатира между серумния ендостатин, възрастта, ИТМ и КЗ на 60^{та} мин. в рамките на ОГТТ, както и между киспептин 10 и креатинин.

Заключение: Киспептин 10 може да се разглежда като маркер, предсказващ риска от развитие на метаболитно отклонение.

Ключови думи: ендостатин, киспептин-10, предиабет, сърдечно-съдов риск

Въведение

Захарният диабет е един от най-сериозните здравни проблеми, достигащ тревожно разпространение през последното десетилетие. През 2019 г. беше установено, че 463 милиона души на възраст 20-79 години имат захарен диабет (1). Като хетерогенен синдром, захарен диабет тип 2 (ЗДт²) се характеризира с нарушение във въгледехидратния и липидния метаболизъм. По-голямата част от индивидите със ЗДт² са с централен тип затлъстяване, което потвърждава решаващата роля на мастната тъкан в патогенезата на захарния диабет (2).

Затлъстяването е резултат от действието на редица патогенетични фактори, включително хроничен дисбаланс между приема на калории и енергийния разход. То включва нискостепенно, хронично възпаление, допринасящо за метаболитната дисфункция и инсулиновата резистентност (IR) (3). Въпреки че молекулните механизми, лежащи в основата на това възпаление не са напълно изяснени, широко известно е и научно доказано, че активирането на макрофагите в мастната тъкан предшества развитието на IR и допринася за провъзпалителното състояние (4,5).

Киспептинът е открит през 1996 г. в контекста на онкологичната биология и първоначално е наречен местатин поради функцията му да потиска меланомните метастази (6). Понижени киспептинови нива са открити в плазмата на бременни жени със захарен диабет тип 1 и хипертония, както и такива с обезитет и пре-еклампсия. По-ниски серумни нива са установени и при лица с остър коронарен синдром в сравнение със здрави контроли (7). Противоположно на тези данни, в други проучвания са констатирани повишени нива на серумния киспептин при други патологични отклонения (8,9). Необходими са бъдещи проучвания за точната връзка между киспептина, респективно киспептин 10, и свързаните метаболитни и сърдечно съдови рискови фактори.

Ендостатинът, представляващ фрагмент на С-терминалния домейн на колаген XVIII, инхибира ендотелната клетъчна миграция, индуцира ендотелната клетъчна апоптоза и се смята, че играе важна роля в развитието на атеросклеротичния процес, камерното ремоделиране и развиващата се последствие сърдечна недостатъчност (10,11). Някои проучвания дори подкрепят становището за протективната роля на ендостатина в развитието на сърдечно-съдовите заболявания, докато според други повишената му експресия е свързана с прогресия на атеросклеротичния процес (12-14).

Целта на настоящото проучване е да се сравнят серумните нива на Киспептин 10 и Ендостатин като маркери за ендотелна дисфункция при лица със затлъстяване без гликемични нарушения, такива с предиабет и новодиагностициран захарен диабет, както и да се оцени връзката им с някои инструментални показатели за микро- и макросъдови увреждания.

Материали и методи

В настоящето проучване бяха включени общо 163 лица на средна възраст 52,45±11,27 години в диапазона 31–74 години, изследвани в Клиниката по Ендокринология и болести на обмяната към УМБАЛ „Александровска“, МУ, София за периода 2018 - 2020 г., разпределени в следните основни групи:

1. Група 1 – лица със затлъстяване без въгледехидратни нарушения – общо 40 пациенти;
2. Група 2 – лица с предиабет – общо 42 пациенти;
3. Група 3 – лица с новодиагностициран захарен диабет – общо 59 пациенти;
4. Контролна група – здрави доброволци, без данни за гликемични нарушения, затлъстяване и наднормено тегло и липса на установено ССЗ – общо 42 души.

От включените участници в проучването 49 (30,1%) са мъже и 114 (69,9%) – жени. При участниците от трите патологични групи бяха извършени следните клинични изследвания и лабораторни изследвания: тегло, ръст, обиколка на талията, обиколка на ханша, измерване на систолното (САН) и диастолното (ДАН) налягане, орален глюкозо толерантен тест (ОГТТ) с венозно измерване на кръвна захар (КЗ) и имунореактивен инсулин (ИРИ) на 0^{та}, 60^{та} и 120^{та} минута, серумни нива на общ холестерол, HDL-холестерол, LDL-холестерол, триглицериди (ТГ), чернодробни ензими. Изчислени бяха следните индекси и съотношения: индекс на телесна маса (ИТМ) = теглото в килограми, разделено на ръста в метри на квадрат (кг)/м² и VAI (visceral adiposity index; индекс за висцерално затлъстяване) – изчислен по следните формули:

$$\text{За жени: VAI} = (\text{WC} 36,58 + (1,89 \times \text{BMI})) \times (\text{TG}/0,81) \times (1,52/\text{HDL}).$$

$$\text{За мъже: VAI} = (\text{WC} 39,68 + (1,88 \times \text{BMI})) \times (\text{TG} /1,03) \times (1,31/\text{HDL})$$

Предиабет се приема по критериите на СЗО и включва: плазмена глюкоза на гладно $\geq 6,1$ mmol/l и $< 7,0$ mmol/l = „нарушена гликемия на гладно“ (НГГ) и/или плазмена глюкоза на 2-ри час след орално обременяване с глюкоза $\geq 7,8$ mmol/l и $< 11,1$

mmol/l = „нарушен глюкозен толеранс“ (НГТ) и/или HbA_{1c} ≥5,7% и <6,5%.

За оценка на инсулиновата резистентност и чувствителност използвахме:

HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance), изчислен от стойностите на глюкозата (mmol/l) и инсулина (mU/l), измерени на гладно по следната формула – HOMA-IR = Инсулин на гладно x глюкоза /22,5. Инсулинова резистентност приехме при стойности на HOMA-IR ≥ 2,5.

За поставяне на диагнозата *метаболически синдром* използвахме критериите на International Diabetes Federation (IDF), National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), World Heart Federation (WHF), the International Atherosclerosis Society (IAS) и American Heart Association (AHA), 2009. Според тези критерии диагнозата МС се приема при наличието на поне 3 от следните 5 критерия:

1. Абдоминално затлъстяване (обиколка на талията >94 см за мъже и >80 см за жени);
2. Повишени ТГ (>1,7 mmol/l);
3. Намален HDL-холестерол (< 1,0 mmol/l за мъже и < 1,3 mmol/l за жени) или провеждано лечение за дислипидемия;
4. Артериално налягане >130 mm Hg за систолното или >85 mm Hg за диастолното, или прием на антихипертензивни медикаменти за лечение на артериална хипертония;
5. Плазмена глюкоза на гладно >5,6 mmol/l или лечение на ЗДМТ2.

Дислипидемия приехме при LDL-холестерол ≥3,2mmol/l и/или HDL-холестерол ≤1,3 mmol/l за жените и ≤1,03 mmol/l за мъжете и/или ТГ ≥1,7 mmol/l и/или провеждано лечение със статин, фибрат или друг медикамент.

Допълнително проведохме и следните инструментални изследвания: измерване на интима

медиа дебелина на а. carotis com. (IMT) чрез системата Cardio Health Station (Panasonic, Japan); изследване на сугомоторна дисфункция и като показател за автономната нервна система с апарат SudoScan (Impeto Medical, Paris, France); изчисляване на индекса глезен/мишница (Ankle-Brachial Index – ABI); изследване за наличие на периферна невропатия и изчисляване на риска за периферна невропатия (NDS); изследване на вибрационна чувствителност с биотезиометър;

При контролната група бяха изчислени антропометричните показатели и се изследваха маркерите за ендотелна дисфункция (киспептин-10 и ендостатин).

Серумните нива на киспептин-10 и ендостатин са изследвани чрез ELISA метод.

Данните са въведени и обработени със статистическия пакет IBM SPSS Statistics 25.0. и MedCalc Version 14.8.1. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, бе прието p<0,05.

Резултати

Резултатите от сравнителния анализ между групите – затлъстяване без възгледиратни нарушения, предиабет, захарен диабет и здравите контроли и антропометрични характеристики са представени в Таблицы 1 и 2.

Четири групи се различават статистически значимо по всички, включени в таблицата показатели без възрастта. И при четирите антропометрични показателя контролите имат сигнификантно по-ниски средни стойности спрямо патологичните групи (които не се различават статистически помежду си).

По-високи нива на общия холестерол и ТГ, как-

Таблица 1. Сравнителен анализ на изследваните групи по антропометричните характеристики.

Показатели	Здравни контроли			Затлъстяване Група 1			Предиабет Група 2			Диабет Група 3		
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD
Възраст (години)	42	49,38	12,12	40	52,68	9,98	42	53,71	11,70	39	54,18	10,86
BMI (kg/m ²)	42	23,07	1,30	40	34,26*	2,79	42	36,33	4,75	39	35,78*	5,72
Талия (см)	42	82,71	6,85	39	105,87*	11,43	42	106,43*	11,87	38	107,13*	14,29
Отношение талия-ханш	42	0,84	0,03	38	0,91**	0,09	42	0,91**	0,10	31	0,95**	0,17
Отношение талия-ръст	42	0,49	0,03	39	0,64*	0,06	42	0,65*	0,07	38	0,65*	0,07

* p<0.05 спрямо контролна група

** p<0.001 спрямо контролна група

Таблица 2.

Сравнителен анализ на изследваните групи по сърдечно-съдовите рискови фактори.

Показатели	Затлъстяване Група 1			Прегуабет Група 2			Диабет Група 3		
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD
САН (mmHg)	40	130,88	5,02	42	134,29	17,83	39	138,85	20,24
ДАН (mmHg)	40	82,38	10,50	42	85,24	10,42	39	85,00	13,91
Холестерол (mmol/l)	40	5,05*	0,86	39	5,26	1,01	39	5,65	1,06
LDL (mmol/l)	39	3,10	0,74	39	3,19	0,97	39	3,36	1,03
HDL (mmol/l)	40	1,27*	0,30	41	1,27*	0,32	39	1,09	0,29
ТГ (mmol/l)	39	1,38	0,50	41	1,68°	0,66	38	2,31°	1,54

p<0,05 спрямо Група 3; < p<0,05 спрямо Група 1

Таблица 3. Сравнителен анализ на изследваните групи по нивата на маркерите.

Показатели	Контроли			Затлъстяване			Прегуабет			Диабет		
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD
Киспептин 10 (ng/ml)	42	2,76	4,05	40	1,87	2,21	42	1,96	2,47	39	1,64	1,40
Ендостатин (ng/ml)	42	1,05	0,58	40	1,05	0,34	42	1,11	0,44	39	1,17	0,46

Таблица 4.

Сравнителен анализ на нивата на изследваните маркери според наличието или липсата на метаболитен синдром.

Маркери	Метаболитен синдром						
	Не			Да			P
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	
Киспептин 10 (ng/ml)	21	2,62	2,76	100	1,66	1,88	0,043
Ендостатин (ng/ml)	21	1,05	0,33	100	1,12	0,43	0,492

Маркери	Артериална хипертония						P
	Не			Да			
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	
Киспептин 10 (ng/ml)	19	2,91	3,56	102	1,63	1,62	0,032
Ендостатин (ng/ml)	19	1,03	0,28	102	1,12	0,44	0,417

Таблица 5.

Сравнителен анализ на нивата на изследваните маркери според наличието или липсата на артериална хипертония.

то и по ниски на HDL-холестерол се наблюдаваха при лицата с новооткрит захарен диабет (Табл. 2).

Не се установи разлика в нивата на киспептин-10 и ендостатин между изследваните патологични групи (Табл. 3). Нивата на киспептин-10 са по-ниски при лицата с метаболитен синдром и тези с артериална хипертония спрямо тези без

съответните нарушения (1,66±1,88 vs 2,62±2,76 ng/ml; 1,63±1,62 vs. 2,91±3,56 ng/ml; p<0,05) (Табл. 4 и 5). Позитивна връзка се констатира между серумния ендостатин, възрастта, ИТМ и КЗ на 60-та мин. в рамките на ОГТТ, както и между киспептин 10 и креатинин (Табл. 6).

Таблица 6. Корелационни коефициенти между нивата на изследваните маркери и някои антропометрични и биохимични показатели.

Показатели	Киспептин 10	Ендостатин
Възраст	0,044	0,166*
ИТМ (кг/м ²)	-0,121	0,177*
Талия (см)	-0,019	0,145
Т/Х	-0,031	-0,049
Т/Р	-0,003	0,154
VAI	0,044	-0,101
САН (mmHg)	-0,113	0,141
ДАН (mmHg)	-0,142	0,061
Холестерол (mmol/l)	0,007	0,000
LDL (mmol/l)	0,026	-0,016
HDL (mmol/l)	0,055	0,047
ТГ (mmol/l)	0,086	-0,095
Креатинин (μmol/l)	0,179*	-0,160
Пик. к-на (μmol/l)	0,066	0,052
АСАТ (U/l)	-0,124	-0,080
АЛАТ (U/l)	-0,103	0,016
ГГТ (U/l)	-0,056	0,017
КЗ 0 ^{ва} мин. (mmol/l)	0,001	0,119
КЗ 60 ^{та} мин. (mmol/l)	0,096	0,200*
КЗ 120 ^{та} мин. (mmol/l)	0,094	0,100
ИРИ 0 ^{ва} мин. (mU/l)	0,036	0,015
ИРИ 60 ^{та} мин. (mU/l)	0,002	0,057
ИРИ 120 ^{та} мин. (mU/l)	0,095	-0,070
НОМА	0,029	0,016
QUICKI	-0,029	-0,016

* - $p < 0,05$

Обсъждане

Това проучване предоставя данни за серумните концентрации на киспептин-10 и ендостатин в целия спектър на въглехидратните нарушения при пациенти със затлъстяване.

Киспептин 10 има важна роля в репродуктивната регулация, глюкозната хомеостаза, хранителния прием и телесния състав като *in vitro* експерименти докладват, че киспептините участват в процеса на вазоконстрикция на коронарните и умбиликалните съдове (15-16). Същевременно оскъдни и доста противоречиви са данните за връзката на серумните нива на киспептина с редица патологични състояния, в това число ИБС и захарен диабет.

Докладвано е, че нивата на киспептин 10 са понижени при бременни жени със ЗД тип 1, както и такива с прееклампсия и обезитет.

По-ниски серумни нива са установени и при лица с остър коронарен синдром в сравнение със здравите контроли (17-20). В нашето проучване наблюдавахме тенденция към по-ниски нива на киспептин 10 при трите патологични групи (затлъстяване; предиабет; диабет) в сравнение с контролната група, но без достигане на статистическа значимост. Не се установи разлика в нивата на киспептин 10 между лицата с и без въглехидратни нарушения, с и без инсулинова резистентност. По-ниски нива на киспептин с гранична значимост се констатираха при лицата с артериална хипертония ($p=0,032$), както и тези с метаболитен синдром ($p=0,043$).

По отношение на връзката между нивата на киспептин 10 и изследваните лабораторни и антропометрични показатели, единствено слаба позитивна корелация се установи със серумния креатинин. Допълнително анализирахме киспептин-10 в рамките на показателите за микро- и макроангиопатия (индекса глезен мишница, интима медиа дебелина, индекса за периферна невропатия, вибрационен праг), но не открихме сигнификантна връзка между тях.

В нашето проучване не се установи значима разлика в нивата на ендостатина сред изследваните групи. Лицата с въглехидратни нарушения, затлъстяване и метаболитен синдром имаха тенденция към по-високи нива на серумния ендостатин спрямо тези без съответните метаболитни отклонения, но без достигане на статистическа значимост. Слаба позитивна корелация констатирахме между нивата на ендостатина, възрастта, индекса на телесна маса и кръвната захар на 60^{та} минута в рамките на ОГТТ.

Заклучение

Настоящото проучване показва, че киспептин-10 има отношение към развитието на метаболитен синдром. Не се установи разлика в нивата на ендостатина при лица с и без промени във въглехидратната обмяна.

Serum Levels of Kisspeptin-10 and Endostatin in Patients with Obesity and Carbohydrate Disorders

Nedeva, Iveta S.¹, Gateva, Antoaneta T.¹, Assyov, Yavor S.¹, Karamfilova, Vera N.¹, Velikova, Tsvetelina V.², Kamenov, Zdravko A.¹

¹ Department of Internal Medicine, Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, University Hospital „Alexandrovska“ Medical University - Sofia, Bulgaria.

² Department of Clinical Immunology, University Hospital „Lozenetz“, Sofia, Bulgaria

Address for correspondence:

Iveta Nedeva, MD,

Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, University Hospital „Alexandrovska“,

1 „Georgy Sofiiski“ Str., 1431 Sofia, Bulgaria

e-mail: iveta_nedeva@yahoo.com

Submitted: 29. 06. 2021

Accepted: 29. 08. 2021

Abstract

Background: Endostatin, a fragment of collagen XVIII, is a promising marker of cardiovascular damage. Kisspeptin plays an important role in reproductive regulation, glucose homeostasis, food intake and body composition.

Objective: To compare serum levels of Endostatin and Kisspeptin 10 as markers of endothelial dysfunction in obese persons without glycemic disorders, as well as in persons with prediabetes and newly diagnosed diabetes mellitus, and to evaluate their relationship with some instrumental indicators of micro- and macrovascular damage.

Materials and methods: A total of 163 persons with an average age of 52,45±11,27 years were studied, divided into four groups: Group 1 – persons with obesity without carbohydrate disorders; Group 2 – persons with prediabetes and Group 3 – persons with newly diagnosed diabetes mellitus. The control group of healthy individuals included 42 people. Serum levels of kisspeptin-10 and endostatin were examined by ELISA.

Results: No difference in the levels of kisspeptin-10 and endostatin was found between the studied pathological groups. Kisspeptin-10 levels were lower in subjects with metabolic syndrome and those with arterial hypertension compared to those without the corresponding disorders. No statistically significant difference in endostatin levels was found among the study groups. A positive relationship was found between serum endostatin, age, BMI and blood pressure, glucose at 60 min within OGTT, as well as between kisspeptin 10 and creatinine.

Conclusion: Kisspeptin 10 can be considered as a marker predicting the risk of developing metabolic abnormalities.

Key words: endostatin, kisspeptin-10, prediabetes, CVD

Introduction

Diabetes is one of the world's most serious health problems, reaching alarming proportions in the last decade. In 2019, it was found that 463,0 million adults aged 20-79 years have diabetes (1). As a heterogeneous syndrome, type 2 diabetes mellitus (T2DM) is characterized by a disorder in carbohydrate and lipid metabolism. The majority of individuals with T2DM have a central type of

obesity, which confirms the crucial role of adipose tissue in the pathogenesis of diabetes mellitus (2).

Obesity is the result of a chronic imbalance between calorie intake and energy expenditure, characterized as low-grade, chronic inflammation, contributing to metabolic dysfunction and insulin resistance (IR) (3). Although the molecular basis underlying this inflammation is not fully understood, it is widely known and scientifically proven that the activation of macrophages in adipose

tissue precedes the development of IR and contributes to the pro-inflammatory condition (4,5).

Kisspeptin was discovered in 1996 in the context of oncological biology and was originally called mes-tatin because of its function of suppressing melanoma metastases (6). Decreased kisseptin levels have been found in the plasma of pregnant women with type 1 diabetes mellitus and hypertension, as well as those with obesity and preeclampsia. Lower serum levels have also been found in subjects with acute coronary syndrome compared to healthy controls (7). In contrast to these data, other studies have found elevated serum kisseptin levels in other pathological abnormalities (8,9). Future studies are needed on the exact relationship between kisseptin and kisseptin 10, respectively, and related metabolic and cardiovascular risk factors.

Endostatin, a fragment of the C-terminal domain of collagen XVIII, inhibits endothelial cell migration, induces endothelial cell apoptosis and is thought to play an important role in the development of the atherosclerotic process, ventricular remodeling and subsequently the development of heart failure (10,11). However, the data related to the effect of endostatin on the vascular wall and the heart myocardium are contradictory. Some studies support the view of the protective role of endostatin in the development of cardiovascular disease, while according to others, its increased expression is associated with the progression of the atherosclerotic process (12-14).

The aim of the present study was to compare serum levels of Kisspeptin 10 and Endostatin as markers of endothelial dysfunction in obese persons without glycemic disorders and those with prediabetes and newly diagnosed diabetes mellitus, and to assess their relationship with some instrumental indicators for micro- and macrovascular complications.

Materials and methods

The present study included a total of 163 individuals with an average age of $52,45 \pm 11,27$ years in the 31-74 age range, studied at the Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases at the University Hospital „Alexandrovska“, MU, Sofia for the period 2018-2020. divided into the following main groups:

1. Group 1 – obese people without carbohydrate disorders - a total of 40 patients;
2. Group 2 – people with prediabetes – a total of 42 patients;
3. Group 3 – people with newly diagnosed diabetes mellitus – a total of 59 patients;
4. Control group – a total of 42 healthy volunteers without evidence of glycemic disorders, obesity and overweight and lack of established CVD.

Of the sample participants in the survey 49 (30,1%) were men and 114 (69,9%) women. In the

study participants from the three pathological groups underwent the following clinical measurements and laboratory tests: weight, height, waist circumference, hip circumference, measurement of systolic (SAN) and diastolic (DAN) pressure; oral glucose tolerance test (OGTT) with venous measurement of blood glucose (BG) and immunoreactive insulin (IRI) at 0,60 and 120 minutes, serum levels of total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides (TG), liver enzymes. The following indices and ratios were calculated: body mass index (BMI) = weight in kilograms divided by height in meters squared (kg / m^2); VAI (visceral adiposity index; visceral obesity index) - calculated according to the following formulas:

For women: $\text{VAI} = (\text{WC } 36,58 + (1,89 \times \text{BMI})) \times (\text{TG} / 0,81) \times (1,52 / \text{HDL})$.

For men: $\text{VAI} = (\text{WC } 39,68 + (1,88 \times \text{BMI})) \times (\text{TG} / 1,03) \times (1,31 / \text{HDL})$.

The diagnosis of *prediabetes* was made according to WHO criteria and includes: fasting plasma glucose $\geq 6,1$ mmol/l and $< 7,0$ mmol/l - „impaired fasting glucose“ (IFG), and/or plasma glucose at 2 hours after oral glucose loading $\geq 7,8$ mmol/l and $< 11,1$ mmol/l - „impaired glucose tolerance“ (IGT); and/or $\text{HbA}_{1c} \geq 5,7\%$ and $< 6,5\%$.

To assess *insulin resistance and sensitivity*, we used HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance), calculated from the fasting levels of glucose (mmol/l) and insulin (mIU/l) according to the following formula - $\text{HOMA-IR} = \text{Fasting insulin} \times \text{glucose} / 22,5$. Insulin resistance was accepted at $\text{HOMA-IR} \geq 2,5$.

To diagnose *metabolic syndrome*, we used criteria from the International Diabetes Federation (IDF), the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), the World Heart Federation (WHF), the International Atherosclerosis Society (IAS), and the American Heart Association. (AHA), 2009. According to these criteria, the diagnosis of MS is accepted in the presence of at least 3 of the following 5 criteria:

1. Abdominal obesity (waist circumference > 94 cm for men and > 80 cm for women);
2. Elevated TG ($> 1,7$ mmol/l);
3. Reduced HDL-cholesterol ($< 1,0$ mmol/l for men and $< 1,3$ mmol/l for women) or treatment for dyslipidemia;
4. Blood pressure > 130 mmHg for systolic or > 85 mmHg for diastolic BP, or taking antihypertensive drugs for treatment of arterial hypertension;
5. Fasting plasma glucose $> 5,6$ mmol/l or treatment of T2DM.

Dyslipidemia was observed in $\text{LDL} \geq 3,2$ mmol/l and/or $\text{HDL} \leq 1,3$ mmol/l for women and $\leq 1,03$ mmol/l for men and/or $\text{TG} \geq 1,7$ mmol/l, and/or therapy with statin, fibrate or other medication.

In addition, we conducted the following instrumental research: measuring the intima media thickness

of the arteria carotis (IMT) through the Cardio Health Station system (Panasonic, Japan); study of vasomotor dysfunction and as an indicator of the autonomic nervous system with a SudoScan device (Impeto Medical, Paris, France); ankle/brachial index (ABI) calculation; peripheral neuropathy testing and peripheral neuropathy risk calculation (NDS); vibration sensitivity test with a biotesiometer.

In the control group, anthropometric parameters were calculated and endothelial dysfunction markers (kisspeptin-10 and endostatin) were examined.

Serum levels of kisspeptin-10 and endostatin in all participants were determined by ELISA.

The data were entered and processed with the IBM SPSS Statistics 25.0 statistical package. and MedCalc Version 14.8.1. As a significance level at which the null hypothesis is rejected, $p < 0,05$ was assumed.

Results

The results of the comparative analysis between the groups – obesity without carbohydrate disorders, prediabetes, diabetes mellitus and healthy controls and anthropometric characteristics are presented in *Table 1*. The four groups differed statistically significantly in all indicators included in the table without age. As concerns all four parameters, the controls had significantly lower mean values compared to the pathological groups (that did not differ statistically).

Higher levels of total cholesterol and TG, as well as lower HDL levels, were observed in individuals with newly diagnosed diabetes mellitus (*Table 2*).

No difference in the levels of kisspeptin-10 and endostatin was found between the studied pathological groups (*Table 3*). Kisspeptin-10 levels were lower in subjects with metabolic syndrome and those with

arterial hypertension compared to those without the corresponding disorders ($1,66 \pm 1,88$ vs $2,62 \pm 2,76$; $1,63 \pm 1,62$ vs. $2,91 \pm 3,56$; $p < 0,05$) (*Tables 4 and 5*). No statistically significant difference in endostatin levels was found among the study groups.

A positive relationship was found between serum endostatin, age, BMI and blood pressure, glucose at 60 min within OGTT, as well as between kisspeptin 10 and creatinine (*Table 6*).

Discussion

This study provided data on serum concentrations of kisspeptin-10 and endostatin across the spectrum of carbohydrate disorders in obese patients.

Kisspeptin 10 plays an important role in reproductive regulation, glucose homeostasis, nutritional intake and body composition as in vitro experiments report that kisspeptins are involved in the process of vasoconstriction of coronary and umbilical vessels (15-16). Concomitantly, data on the association of serum kisspeptin levels with a number of pathological conditions, including coronary heart disease and diabetes, are scarce and quite contradictory. Kisspeptin 10 levels have been reported to be decreased in pregnant women with type 1 diabetes, as well as those with preeclampsia and obesity. Lower serum levels were also found in subjects with acute coronary syndrome compared to healthy controls (17-20). In our study, we observed a trend to lower levels of kisspeptin 10 in the three pathological groups (obesity; prediabetes; diabetes) compared to the control group, but without reaching significant differences.

No difference in kisspeptin 10 levels was found between individuals with and without carbohydrate disorders or with and without insulin resistance. Lower levels of marginal significance of kisspeptin have been

Table 1. Anthropometric characteristics of the study groups.

Parameters	Controls			Obesity Group 1			Prediabetes Group 2			Diabetes Group 3		
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD
Age	42	49,38	12,12	40	52,68	9,98	42	53,71	11,70	39	54,18	10,86
BMI (kg/m ²)	42	23,07	1,30	40	34,26*	2,79	42	36,33	4,75	39	35,78*	5,72
Waist	42	82,71	6,85	39	105,87*	11,43	42	106,43*	11,87	38	107,13*	14,29
WHR	42	0,84	0,03	38	0,91**	0,09	42	0,91**	0,10	31	0,95**	0,17
WSR	42	0,49	0,03	39	0,64*	0,06	42	0,65*	0,07	38	0,65*	0,07

* $p < 0,05$ compared to control group

** $p < 0,001$ compared to control group

BMI – Body mass index; WSR– waist to stature ratio; WHR – waist to hip ratio

Table 2.

Cardiovascular risk factors.

Parameters	Obesity Group 1			Prediabetes Group 2			Diabetes Group 3		
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD
SP (mm Hg)	40	130,88	5,02	42	134,29	17,83	39	138,85	20,24
DP (mm Hg)	40	82,38	10,50	42	85,24	10,42	39	85,00	13,91
TChol (mmol/l)	40	5,05*	0,86	39	5,26	1,01	39	5,65	1,06
LDL-chol (mmol/l)	39	3,10	0,74	39	3,19	0,97	39	3,36	1,03
HDL (mmol/l)	40	1,27*	0,30	41	1,27*	0,32	39	1,09	0,29
TG (mmol/l)	39	1,38	0,50	41	1,68°	0,66	38	2,31°	1,54

*p<0,05 compared to Group 3; ° p<0,05 compared to Group 1;
TChol – total cholesterol; TG – triglycerides; SP – systolic pressure;
DP – diastolic pressure

Table 3. Comparison of the studied markers between groups.

Parameters	Controls			Obesity			Prediabetes			Diabetes		
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD
Kisspeptin10 (ng/ml)	42	2,76	4,05	40	1,87	2,21	42	1,96	2,47	39	1,64	1,40
Endostatin (ng/ml)	42	1,05	0,58	40	1,05	0,34	42	1,11	0,44	39	1,17	0,46

Table 4.

Levels of markers in patients with and without metabolic syndrome.

Markers	Metabolic syndrome						P
	No			Yes			
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	
Kisspeptin 10 (ng/ml)	21	2,62	2,76	100	1,66	1,88	0,043
Endostatin (ng/ml)	21	1,05	0,33	100	1,12	0,43	0,492

Markers	Hypertension						P
	No			Yes			
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	
Kisspeptin 10 (ng/ml)	19	2,91	3,56	102	1,63	1,62	0,032
Endostatin (ng/ml)	19	1,03	0,28	102	1,12	0,44	0,417

Table 5.

Levels of markers in patients with and without hypertension.

observed in individuals with hypertension ($p=0,032$) as well as those with metabolic syndrome ($p=0,043$). Regarding the relationship between kisspeptin 10 levels and the laboratory and anthropometric parameters studied, only a weak positive correlation was found with serum creatinine. We further analyzed kisspeptin-10 within the indicators for micro- and macroangiopathy (ankle brachial index, intima media thickness, peripheral neuropathy index, vibration threshold), but found no significant relationship between them.

In our study, no significant difference in endostatin levels was found among the study groups. Individuals with carbohydrate disorders, obesity, and metabolic syndrome had higher levels of serum endostatin than those without the corresponding metabolic abnormalities, but without reaching statistical significance. We found a weak, positive correlation between endostatin levels, age, body mass index and blood sugar at 60 minutes within OGTT.

Conclusion

The present study indicates that kisspeptin-10 is involved in the development of metabolic syndrome. No difference in endostatin levels was found in individuals with and without changes in carbohydrate metabolism.

Table 6. Correlation between Kisspeptin-10, Endostatin and laboratory and instrumental parameters.

Parameters	Kisspeptin 10	Endostatin
Age	0,044	0,166*
BMI (kg/m ²)	-0,121	0,177*
Waist (cm)	-0,019	0,145
WHR	-0,031	-0,049
WSR	-0,003	0,154
VAI	0,044	-0,101
SBP (mm Hg)	-0,113	0,141
DBP (mm Hg)	-0,142	0,061
TChol (mmol/l)	0,007	0,000
LDL-chol (mmol/l)	0,026	-0,016
HDL-chol (mmol/l)	0,055	0,047
TG (mmol/l)	0,086	-0,095
Creatinine (μmol/l)	0,179*	-0,160
Uric acid (μmol/l)	0,066	0,052
ASAT (U/l)	-0,124	-0,080
ALAT(U/l)	-0,103	0,016
GGT (U/l)	-0,056	0,017
Glucose 0 min (mmol/l)	0,001	0,119
Glucose 60 min (mmol/l)	0,096	0,200*
Glucose 120 min (mmol/l)	0,094	0,100
IRI 0 min (mIU/l)	0,036	0,015
IRI 60 min (mIU/l)	0,002	0,057
IRI 120 min (mIU/l)	0,095	-0,070
HOMA	0,029	0,016
QUICKI	-0,029	-0,016

* - $p < 0,05$

References

1. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al.; IDF Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract* 2019; 157: 107843.
2. Hotamisligil G. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes* 2009; 32, S7, S52-S54.
3. Hotamisligil G. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444:860-867.
4. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1821-1830.
5. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester J, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 2014; 40(2): 274-288.
6. Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin—the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984; 98(4): 1591-1596.
7. Izzzi-Engbeaya C, Comminos AN, Clarke SA, Jomard A, Yang L, Jones S, et al. The effects of kisspeptin on β -cell function, serum metabolites and appetite in humans. *Diabetes Obes Metab* 2018; 20(12): 2800-2810.
8. Clarke SA, Dhillo WS. Kisspeptin across the human lifespan: evidence from animal studies and beyond. *J Endocrinol* 2016; 229(3): R83-98.
9. Saito R, Tanaka K, Nishimura H, Nishimura K, Sonoda S, Ueno H, et al. Centrally administered kisspeptin suppresses feeding via nesfatin-1 and oxytocin in male rats. *Peptides* 2019; 112: 114-124.
10. Skorupskaitė K, George JT, Anderson RA. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum Reprod Update* 2014; 20(4): 485-500.

11. Zeng X, Chen J, Miller YI, Javaherian K, Moulton KS. Endostatin binds biglycan and LDL and interferes with LDL retention to the subendothelial matrix during atherosclerosis. *J Lipid Res* 2005;46(9): 1849–1859.
12. Mitsuma W, Kodama M, Hanawa H, Ito M, Ramadan MM, Hirono S, et al. Serum endostatin in the coronary circulation of patients with coronary heart disease and its relation to coronary collateral formation. *Am J Cardiol* 2007; 99(4): 494–498.
13. Sponder M, Dangl D, Kampf S, Fritzer-Szekeres M, Strametz-Juraneck J. Exercise increases serum endostatin levels in female and male patients with diabetes and controls. *Cardiovasc Diabetol* 2014; 13: 6.
14. El-Ashmawy HM, Roshdy HS, Saad Z, Ahmed AM. Serum endostatin level as a marker for coronary artery calcification in type 2 diabetic patients. *J Saudi Heart Assoc* 2019; 31(1): 24–31.
15. Wang T, Cui X, Xie L, Xing R, You P, Zhao Y, et al. Kisspeptin Receptor GPR54 Promotes Adipocyte Differentiation and Fat Accumulation in Mice. *Front Physiol* 2018; 9: 209.
16. Jayasena CN, Nijher GM, Comninou AN, Abbara A, Januszewski A, Vaal ML, et al. The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(12): E1963-1972.
17. Zhang Y, Hou Y, Wang X, Ping J, Ma Z, Suo C, et al. The effects of kisspeptin-10 on serum metabolism and myocardium in rats. Bader M, editor. *PLOS ONE* 2017; 12(7): e0179164.
18. Sawyer I, Smillie S-J, Bodkin JV, Fernandes E, O'Byrne KT, Brain SD. The vasoactive potential of kisspeptin-10 in the peripheral vasculature. *PLOS ONE* 2011; 6(2): e14671.
19. Sato K, Shirai R, Hontani M, Shinooka R, Hasegawa A, Kichise T, et al. Potent Vasoconstrictor Kisspeptin-10 Induces Atherosclerotic Plaque Progression and Instability: Reversal by its Receptor GPR54 Antagonist. *J Am Heart Assoc* 2017; 6(4).
20. Cetković A, Miljic D, Ljubić A, Patterson M, Ghatei M, Stamenković J, et al. Plasma kisspeptin levels in pregnancies with diabetes and hypertensive disease as a potential marker of placental dysfunction and adverse perinatal outcome. *Endocr Res* 2012; 37(2): 78–88.

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

Хепатокини и тяхната връзка с основни метаболитни и съдови показатели при неалкохолна чернодробна стеатозна болест

Карамфилова, Вера Н.¹, Асьов, Явор С.¹, Недева, Ивета С.¹, Гатева, Антоанета Т.¹, Ивановна, Ирена Д.², Матева, Людмила В.³, Каменов, Здравко А.¹

¹ Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Александровска“, Катедра по Вътрешни болести, МФ, Медицински Университет, София

² Клинична лаборатория, УМБАЛ „Св. Ив. Рилски“ МФ, Медицински Университет, София

³ Клиника по Гастроентерология, УМБАЛ „Св. Ив. Рилски“, Катедра по Вътрешни болести, МФ, Медицински Университет, София

Адрес за кореспонденция:

Д-р Вера Начева Карамфилова г.м.,
Клиника по Ендокринология и болести на обмяната,
УМБАЛ „Александровска“, София – 1431 София, бул. „Г. Софийски“ 1
e-mail: verakaramfilova@abv.bg

Постъпване: 29. 06. 2021г.

Ревизиране: 24. 08. 2021г.

Приемане: 01. 09. 2021г.

Резюме

Въведение: Неалкохолната чернодробна стеатозна болест (НАЧСБ) включва спектър от заболявания, пряко свързани с метаболитния синдром и инсулиновата резистентност, като честотата ѝ сред пациентите със захарен диабет тип 2 придобива епидемични размери. Различни неинвазивни маркери за предсказване на фиброзата, риска от прогресия до цироза или тежки метаболитни нарушения се изследват усилено с цел профилактика, мониториране и лечение.

Цел: Да се изследват серумните нива на Фетуин-А, ангиопоетин-свързан растежен фактор (AGF), и секс-хормон свързващ глобулин (SHBG) и да се оцени връзката им с метаболитните нарушения и с основни показатели за микро- и макроангиопатия при пациенти със затлъстяване и НАЧСБ.

Материали и методи: Изследваният клиничен контингент обхващаше 82 пациенти с НАЧСБ и затлъстяване, от които 46 без възглехидратни нарушения и 36 с предиабет. Серумните нива на Фетуин-А, AGF и SHBG са измерени с помощта на ензимно свързан имunosорбентен анализ (ELISA).

Резултати: Пряко пропорционална корелация бе установена между AGF и съотношението талия/ханш ($r=0.255$), както и обратно пропорционална корелация между SHBG и обиколката на талията ($r=-0.285$) и съотношението талия/ханш ($r=-0.245$). Налице е слаба корелация между Фетуин-А и съотношението глезен-мишница ($r=0.221$). Не се установи значима разлика между изследваните показатели в групите с и без предиабет, както и с наличие на компонентите на метаболитен синдром.

Заключение: Нивата на Фетуин-А, AGF и SHBG не се влияят от възглехидратните нарушения и наличието на метаболитен синдром при пациенти със затлъстяване и НАЧСБ. Изследваните хепатокини не оказват влияние върху показателите за микро- и макроангиопатия.

Ключови думи: неалкохолна чернодробна стеатозна болест, предиабет, хепатокини, метаболитен синдром.

Въведение

Неалкохолната стеатозна чернодробна болест (НАЧСБ) е най-честото чернодробно заболяване както при възрастните, така и при децата и представлява значителен здравен проблем с големи здравни разходи и повишена смъртност. Пряко свързана е със затлъстяването, метаболитния синдром (МС) и инсулиновата резистентност (ИР).

НАЧСБ е сборно понятие и включва широк спектър от нарушения, в това число неалкохолна чернодробна стеатоза (НАС), неалкохолна стеатозен хепатит (НАСХ), който може да прогресира до фиброза, цироза и хепатоцелуларен карцином (1). Метаболитните изяви на заболяването са водещи още в ранните ѝ етапи на развитие, като пряко се свързват с повишен риск за захарен диабет тип 2 (ЗДт2) и сърдечно-съдови за-

болявания (ССЗ), независимо от традиционните рискови фактори (2,3).

Черният гроб е централен регулатор на системната енергийна хомеостаза и има ключова роля в глюкозния и липидния метаболизъм. Нещо повече, черният гроб е признат за ендокринен орган, който произвежда и отделя редица специфични протеини- хепатокини, които пряко регулират системния метаболизъм и енергийната хомеостаза. Нарушената глюконеогенеза и дислипидемията са едни от най-честите прояви при НАЧСБ, като пряко участие в тези процеси имат секретирания от черния гроб хепатокини (4).

Фетуин-А, известен още като *alpha-2-Heremans-Schmid glycoprotein* (64 kDa) се произвежда основно от черния гроб. При хората Фетуин-А генът е локализиран в хромозома 3q27, която е идентифицирана като суспектен локус за ЗД2 и МС (5). Този мултипотентен хепатокин участва в регулацията на костния метаболизъм, миграцията на кератиноцитите и контрола на протеолитичната активност. Също така се счита за биомаркер на невродегенеративни заболявания, както и за индуктор на ИР, сърдечно-съдов риск, ендотелна дисфункция и субклинична атеросклероза (6). Установено е, че Фетуин-А е инхибитор на инсулин-рецепторната тирозинкиназа в черния гроб и скелетната мускулатура, което е свързано с потискане на автофосфорилацията на тирозинкиназата в инсулиновия рецептор и IRS-1, водещо до ИР (6). Повишената концентрация на наситени мастни киселини чрез NF- κ B, както и повишените нива на кръвна захар чрез ERK 1 и 2 активирани сигнални пътища, индуцират чернодробната синтеза на Фетуин-А (7). От друга страна повишените плазмени нива на Фетуин-А при пациенти с НАЧСБ показва потенциалната му връзка с ИР и чернодробната стеатоза, като се счита за ранен маркер и предиктор на ЗД2 (8).

Ангиопоетин-свързан растежен фактор (AGF), известен още като ангиопоетин-свързан протеин 6 се кодира от гена *Angptl6* и се секретира в кръвообращението след образуването му в черния гроб (9). Установено е, че серумната концентрация на AGF е значително увеличена при пациенти със ЗД2 и МС, като AGF положително корелира с маркерите за ИР и отрицателно с HDL-холестерола (10). Namkung и сътр. установяват повишени нива на AGF при пациенти с МС, като авторите предполагат, че пациентите с МС или ЗД2 могат да бъдат с намалена чувствителност към AGF (11). Една от теориите за механизма чрез който AGF оказва влияние върху метаболизма на глюкозата е, че AGF потиска производството на глюкоза в хепатоцитите по зависим от концентрацията ѝ начин чрез понижаване на експресията на глюкозо-

фосфатазата (11). Анализите *in vitro* показват намалена чернодробна глюконеогенеза след третиране с AGF. Kitazawa и сътр. предполагат, че AGF може да се счита за нова терапевтична цел на ЗД2, затлъстяването, МС, както и на НАЧСБ (12).

Секс-хормон свързващ глобулин (SHBG) се произвежда главно от черния гроб. Основната функция на този хепатокин е транспорта на половите хормони, като циркулиращите му нива се свързват с глюкозния метаболизъм, затлъстяването, както и с останалите компоненти на МС (13). При постменопаузални жени с хистологично доказана НАЧСБ са установени понижени нива на SHBG в сравнение с контролна група, като серумните му концентрации се свързват с НАЧСБ независимо от възрастта, ИТМ и обиколката на талията (14). Връзка между понижените нива на този хепатокин с НАЧСБ също е демонстрирана и при пациенти със ЗД2 (15). Установено, че серумните нива на SHBG намаляват с увеличаване на интрахепаталното съдържание на мазнини, както и обратно, промяната в начина на живот и редуцията на тегло водят до повишаване на SHBG, което е пряко свързано с подобряване на чернодробната стеатоза (16).

Целта на настоящото проучване бе да се изследват серумните нива на хепатокините Фетуин-А, AGF и SHBG и да се оцени връзката им с метаболитните нарушения и с основни показатели за микро-и макроангиопатия при пациенти със затлъстяване и НАЧСБ.

Материали и методика

В проучването бяха включени общо 82 лица, изследвани в Клиниката по Ендокринология и болести на обмяната към УМБАЛ „Александровска“, МУ, София разпределени в следните основни групи:

Група 1 – НАЧСБ със затлъстяване без въгледигратни нарушения (46 пациенти) и

Група 2 – НАЧСБ със затлъстяване и пре-диабет (36 пациенти). Средната възраст на участниците беше $50,6 \pm 10,5$ години в интервала между 32 и 72 години.

Включващи критерии: Възраст ≥ 18 г.; Затлъстяване (ИТМ ≥ 30 kg/m²; и/или обиколка талия > 94 cm за мъжете и > 80 cm за жените); Нарушена гликемия на гладно (НГГ- плазмена глюкоза на гладно равна или по-висока от 5,6 mmol/l и по-ниска от 7,0 mmol/l) и/или нарушен глюкозен толеранс (НГТ - плазмена глюкоза на 2^{ра} час след орално обременяване с глюкоза равна или по-висока от 7,8 mmol/l, но по-ниска от 11,1 mmol/l), HbA_{1c} $< 6,5\%$ и $\geq 5,7\%$ (17); Ехографски базирана диагноза първична неалкохолна стеатозна болест; Подписано информирано съгласие.

Изключващи критерии: Алкохолна болест на черния гроб; Консумация на алкохол > 20 g абсо-

лютен алкохол дневно за жените и >30 g за мъжете; Вторична неалкохолна стеатозна болест (хепатит С, прием на стеатогенни медикаменти – амиодарон, метотрексат, тамоксифен, кортикостероиди и вродени метаболитни заболявания); Напреднала фиброза и цироза на база ELF тест, NFS, APRI и FIB-4; Захарен диабет (кръвна захар на гладно $\geq 7,0$ mmol/l и/или случайна или на 2^{ра} час след ОГТТ $\geq 11,1$ mmol/l и/или $Hb_{A1c} \geq 6,5\%$); Неопластични заболявания; Хронично бърбечно заболяване (хронична бърбечна болест eGFR < 60 ml/min/1,73 m² изчислен по СКД-ЕРІ формула); Сърдечна недостатъчност III-IV клас по NYHA; Друго ендокринно заболяване (синдром на Кушинг, акромегалия, хипер-/хипотиреоидизъм и др.); други придружаващи заболявания, които биха се отразили на получените резултати.

Проведени бяха следните изследвания: Ръст (см), тегло (кг); Индекс на телесна маса - ИТМ кг/м² (теглото в килограми, разделено на ръста в метри на квадрат); Обиколка на талията (waist circumference – WC), измерена по средата на разстоянието между ребрената гъза и илиачния гребен; Обиколка на ханша (hip circumference – HC), измерена на нивото на големия трохантер; Отношение талия/ханш (waist-to-hip ratio – WHR); Отношение талия/ръст (waist-to-stature ratio – WSR); Телесен състав – оценен чрез биоимпедансен анализ (Tanita, BC408, Япония) – индекс на телесна маса (BMI), мастна маса (Fat mass), процент мастна тъкан (Fat %), свободна от мазнини маса (Fat free mass); стандартни лабораторни изследвания; абдоминална ехография. *Специализирани инструментални изследвания:* Измерване на интима медиа дебелина на а. carotis com. (IMT). Измерването на IMT е неинвазивен ултразвуков биомаркер за ранна атеросклероза. Системата Cardio Health Station (Panasonic, Japan) извършва автоматизирана оценка на IMT. Изследване за судомоторна дисфункция и като показател за автономната нервна система с апарат SudoScan (Impeto Medical, Paris, France). SudoScan е нов метод за бър-

за, неинвазивна оценка и количествено измерване на судомоторната функция. *Изчисляване на индекса глезен/мишница (Ankle-Brachial Index– ABI).* ABI представлява отношението между систолното налягане на глезена и брахиалното систолно налягане и дава информация за наличието на периферна артериална болест. *Изследване за наличие на периферна невропатия* – оценка на тактилен (с помощта на термален дискриминатор) и вибрационен усет (с помощта на 128 Hz камертон и биометриометър) и сухожилно-нагкостни рефлексии (с помощта на неврологично чукче) и изчисляване на риска за периферна невропатия (Neuropathy disability score – NDS). *Изследване на вибрационната чувствителност с биометриометър (Vibration Perception Threshold (VPT) с Ultra Biotesiometer Meteda, USA).* Нормална вибрационна чувствителност (нормален вибрационен праг) <25V и >25V нарушена вибрационна чувствителност.

Серумните нива на хепатокините бяха измерени с помощта на ензимно свързан имуносорбентен анализ (ELISA). *Фетуин А (Human Fetuin A, ELISA kit, Bio Vendor, Czech Republic); AGF (Human Angiopoietin-related growth factor, ELISA Kit, Abbeexa, UK); Секс хормон свързващ глобулин (SHBG, ELISA kit, Dia Source, Belgium).*

Статистическата обработка на резултатите е извършена със статистическия пакет IBM SPSS Statistics 25.0. и MedCalc Version 14.8.1. Приложени са следните методи: Тестове χ^2 и точен тест на Фишер; Еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA; Т-тест на Стюдънт; корелационен анализ и непараметричен тест на Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, бе прието $p < 0,05$.

Резултати

Сравнителният анализ на изследваните групи по възраст и антропометрични показатели е представен в Таблица 1. Сигнификантна разлика

Таблица 1.

Сравнителен анализ на изследваните групи по възраст и антропометрични показатели.

ИТМ, индекс на телесна маса;
WHR, waist to hip ratio, съотношение талия/ханш;
WSR, waist to stature ratio, съотношение талия/ръст.

Показатели	Група 1 n =46		Група 2 n= 36		P
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
Възраст (години)	48,29	10,82	53,36	10,25	0,001
ИТМ (кг/м ²)	37,34	6,63	37,73	5,84	0,341
Талия (см)	110,33	14,01	113,22	12,83	0,115
Ханш (см)	118,72	13,21	117,93	11,92	0,660
WHR	0,94	0,13	0,9	0,15	0,033
WSR	0,68	0,09	0,69	0,08	0,103
Мастна тъкан (%)	46,09	4,58	46,75	6,93	0,217

Таблица 2. Сравнителен анализ на изследваните групи по артериално налягане, метаболитни параметри и хепатокини.

Показатели	Група 1 n =46		Група 2 n= 36		P
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
САН (mmHg)	132,07	16,22	135,21	15,80	0,149
ДАН (mmHg)	85,63	10,02	85,18	10,25	0,145
Общ холестерол (mmol/l)	5,18	1,02	5,28	0,98	0,329
HDL (mmol/l)	1,32	0,33	1,18	0,28	0,008
LDL (mmol/l)	3,22	0,89	3,17	0,93	0,699
VLDL (mmol/l)	0,65	0,28	0,89	0,31	<0,001
ТГ (mmol/l)	1,48	0,81	2,13	1,00	<0,001
КЗ 0 (mmol/l)	5,33	0,52	6,94	2,69	<0,001
КЗ 60 (mmol/l)	8,43	2,31	11,22	2,50	<0,001
КЗ 120 (mmol/l)	5,48	1,48	8,65	2,31	<0,001
Инсулин 0 (mU/L)	15,12	8,66	25,26	29,26	<0,001
Инсулин 60 (mU/L)	107,12	67,83	136,77	105,68	0,024
Инсулин 120 (mU/L)	53,43	42,81	123,88	136,34	<0,001
НОМА-IR	3,78	2,20	7,25	8,40	<0,001
Фетуин А (pg/ml)	717,03	181,84	661,43	148,26	0,141
AGF (mcg/ml)	8,55	1,70	8,15	1,69	0,293
SHBG (nmol/l)	49,85	28,12	43,89	19,48	0,604

САН, систолно артериално налягане; ДАН, диастолно артериално налягане; HDL, липопротеини с висока плътност; LDL, липопротеини с ниска плътност; VLDL, липопротеини с много ниска плътност; ТГ, триглицериди; КЗ 0, кръвна захар на нулева минута; КЗ 60, кръвна захар на 60^{ма} минута; КЗ 120, кръвна захар на 120^{ма} минута; НОМА-IR; индекс за инсулинова резистентност.

се установява само по отношение на възрастта и WHR, като със значимо по-високи средни стойности е групата с предиабет ($p=0,001$; $p=0,033$, съответно). Тъй като има статистически значима разлика между възрастта, двете изследвани групи бяха предварително уеднаквени статистически по този замъгляващ показател. Сравнителният анализ на изследваните групи по отношение на артериално налягане, липиден профил, кръвна захар и инсулин при ОГТТ на 0, 60 и 120 мин., и НОМА- IR е представен в Таблица 2. Резултатите от анализа показваха, че между групите със затлъстяване без въглехидратни нарушения и затлъстяване с предиабет значима разлика еналице при HDL-холестерол, VLDL, ТГ, КЗ и инсулин от ОГТТ и НОМА-IR. Със значимо по-висока средна стойност в групата на предиабет бяха VLDL ($p<0,001$), ТГ ($p<0,001$), КЗ и инсулина от ОГТТ във всеки един от моментите на измерване ($p<0,01$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,01$, $p=0,024$, $p<0,001$, съответно) и НОМА-IR ($p<0,01$). В групата само със затлъстяване статистически достоверно по-високи стойности се установиха при HDL-C ($p=0,008$).

Проведеният корелационен анализ за наличието на зависимост между изследваните хепатокини Фетуин-А, AGF и SHBG и антропометри-

чните показатели установи малък брой корелации. Пряво пропорционална корелация бе установена между AGF и съотношението талия/ханш ($p=0,255$), както и обратно пропорционална корелация между SHBG и обиколката на талията ($p=-0,285$) и съотношението талия/ханш ($p=-0,245$) (Табл. 3).

Не се установи значима разлика между изследваните показатели Фетуин-А, AGF и SHBG в групите с и без предиабет (Табл. 2), както и с компонентите на метаболитния синдром. По отношение на връзката между изследваните хепатокини и показателите за микро-и макроангиопатия се установи слаба корелация само между Фетуин-А и ABI ($p=0,221$).

Обсъждане

НАЧСБ представлява мултисистемно заболяване, при което се нарушава регулирането на множество метаболитни и възпалителни пътища, играещи важна роля в развитието както на ССЗ, така и на ЗДм², като пряко участие в тези процеси заемат хепатокините.

Фетуин-А е идентифициран като ендегенен инхибитор на инсулин-рецепторната тирозин киназа в черния гроб и скелетната мускулатура на гризачи, като дефицитът му при мишки показва подобрена инсулинова чувствителност, което предполага, че Фетуин-А има основна роля в регулирането на инсулиновата сигнализация (6). Съществуват доказателства за връзката между Фетуин-А, затлъстяването, ИР и НАЧСБ (5,18). Няколко студии демонстрират по-високи нива на Фетуин-А при пациенти с хистологично потвърдена НАЧСБ (19). В нашето проучване не установихме разлика в нивата на

Таблица 3.

Коефициенти на корелация между изследваните хепатокини и антропометричните показатели

Показатели	Фетуин А	AGF	SHBG
Възраст	-0,015	0,057	0,181
ИТМ	-0,146	-0,136	-0,217
Талия	-0,023	0,087	-0,285*
Ханш	-0,154	-0,194	-0,042
WHR	0,037	0,255*	-0,245*
WSR	-0,043	-0,013	-0,212
VAI	0,030	0,020	0,021
Мазнини %	-0,248	-0,322	0,032

* - $p < 0,05$

ИТМ, индекс на телесна маса; WHR, waist-to-hip ratio (съотношение талия/ханш); WSR, waist-to-stature ratio (съотношение талия/ръст); VAI, visceral adiposity index (индекс за висцерално затлъстяване)

Фетуин-А в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Не се установи разлика в нивата при пациентите с и без МС, със и без ИР. Съществуват доказателства за връзката на Фетуин-А със ССЗ, независимо от познатите рискови фактори като артериална хипертония и тютюнопушене, като повишените нива се свързват с повишен риск от миокарден инфаркт и мозъчен инсулт (20). Ние анализирахме Фетуин-А в рамките на показателите за микро- и макроангиопатия (ABI, IMT, NDS и VPT), където се установи слаба корелация с ABI.

AGF се секретира предимно от черния дроб и е идентифициран от Oike и сътр. през 2003 г. (9). Авторите установяват, че при експериментални модели мишки ниските нива на AGF се свързват със затлъстяване, ИР и натрупване на липиди в черния дроб и скелетната мускулатура. Този хепатокин се счита, че има важна функция в липидния и въглехидратния метаболизъм и вероятно е протеин, който намалява ИР и затлъстяването (21). Ebert и сътр. установяват, че серумните концентрации на AGF са сигнификантно повишени при пациенти със ЗД2 в сравнение с недиабетици (10). В нашето проучване не установихме разлика в нивата на AGF в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Съществуват данни в литературата за повишени нива на AGF при пациенти с МС в сравнение с контроли, както и че МС е предиктор за серумните му нива (22). Ние не установихме разлика в нивата при пациентите с и без МС, със и без ИР. Не открихме и корелации с показателите

от липидния профил и чернодробните ензими.

От антропометричните показатели се установи корелация между AGF и съотношението талия/ханш. От анализа, който направихме на AGF в рамките на показателите за микро- и макроангиопатия също не бяха открити корелации. In vitro проучвания демонстрират намаляване на чернодробната глюкозна продукция след лечение с AGF, което показва, че може да намери приложение като нов терапевтичен таргет при пациенти с ЗД², затлъстяване, МС, както и с НАЧСБ (12).

SHBG, който се произвежда основно от черния дроб и чиято основна роля е свързана с транспорта на половите хормони, притежава и редица други функции. Той се свързва с глюкозната обмяна, затлъстяването и МС (23). В проучване проведено при постменопаузални жени с хистологично доказана НАЧСБ са установени по-ниски нива в сравнение с контроли, независимо от възрастта, ИТМ и обиколката на талията (14). Също така понижени нива на SHBG са намерени и при пациенти със ЗД² и НАЧСБ (15). В нашето проучване не установихме разлика в нивата на SHBG в двете основни групи, както и връзка с въглехидратните нарушения. Установихме обратнопорционална корелация с обиколката на талията, съотношението талия/ханш, както и с инсулина на 60 мин. от ОГТТ. Някои проучвания докладват понижаване на серумните концентрации на SHBG с увеличаването на чернодробното мастно съдържание, както и че промяната в начина на живот и редукцията на тегло водят до покачване на нивата му (16). Ние не намерихме връзка с МС и неговите компоненти, както и с ИР. Не се установи и разлика също така между пациентките в менопауза и перименопауза.

Резултатите, които получихме за Фетуин-А, AGF и SHBG, вероятно са продуцирани от сравнително близката метаболитна характеристика на основните групи пациенти в проучването, като всички участниците са със затлъстяване и НАЧСБ, което се оказва може би по-силен предиктор за тези хепатокини в сравнение с въглехидратните нарушения и метаболитния синдром като цяло. Необходими са бъдещи проучвания с участието на различни групи лица за уточняване и разбиране на ролята на тези хепатокини в патогенезата на НАЧСБ и връзката им с метаболитните нарушения.

В заключение, нивата на Фетуин-А, AGF и SHBG не се влияят от въглехидратните нарушения и метаболитния синдром при пациенти със затлъстяване и НАЧСБ. Изследваните хепатокини не оказват влияние върху показателите за микро- и макроангиопатия.

Hepatokines and Their Relationship with Basic Metabolic and Vascular Parameters in Non-alcoholic Fatty Liver Disease

Karamfilova, Vera N.¹, Assyov, Yavor S.¹, Nedeva, Iveta S.¹, Gateva, Antoaneta T.¹, Ivanova, Irena D.², Mateva, Ludmila V.³, Kamenov, Zdravko A.¹

¹ Clinic of Endocrinology and Metabolic disease, University Hospital „Alexandrovska“ Department of Internal Medicine Medical University Sofia, Bulgaria

² Clinical Laboratory Department, University Hospital „St. Ivan Rilski“, Medical University of Sofia, Bulgaria

³ Clinic of Gastroenterology, University Hospital „St. Ivan Rilski“, Department of Internal Medicine, Medical University Sofia, Bulgaria

Address for correspondence:

Vera Nacheva Karamfilova, MD,
PhD Clinic of Endocrinology, University Hospital „Alexandrovska“, Sofia
1431 Sofia, 1 „G. Sofiiski“ Blvd, Mob. +359887414399
e-mail: verakaramfilova@abv.bg

Submitted: 29. 06. 2021

Revised: 24. 08. 2021

Accepted: 01. 09. 2021

Abstract

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) includes a range of diseases directly related to metabolic syndrome and insulin resistance, and its incidence among patients with type 2 diabetes is increasing. Various non-invasive markers for predicting fibrosis, the risk of progression to cirrhosis or severe metabolic disorders are being extensively studied for prevention, monitoring and treatment.

Objective: To investigate serum levels of Fetuin-A, angiopoietin-related growth factor (AGF), and sex hormone binding globulin (SHBG) and to assess their relationship to metabolic disorders and to major indicators of micro- and macroangiopathy in patients with obesity and NAFLD.

Materials and methods: The studied clinical contingent included 82 patients with NAFLD and obesity, of which 46 were without carbohydrate disorders and 36 were with prediabetes. Serum levels of Fetuin-A, AGF and SHBG were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: A positive correlation was found between AGF and waist/hip ratio ($r=0,255$), as well as a negative correlation between SHBG and waist circumference ($r=-0,285$) and waist/hip ratio ($r=-0,245$). There was a weak correlation between Fetuin-A and the ankle-brachial index ($r=0,221$). No significant differences were found between the studied parameters in the groups with and without prediabetes, as well as with the components of metabolic syndrome.

Conclusion: Fetuin-A, AGF and SHBG levels are not affected by carbohydrate disorders and the presence of metabolic syndrome in obese patients and NAFLD. The studied hepatokines did not affect the indicators of micro- and macroangiopathy.

Key words: Key words: non-alcoholic liver steatosis, prediabetes, hepatokines, metabolic syndrome.

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver disease in both adults and children and is a significant health problem with high health costs and increased mortality. It is directly related to obesity, metabolic syndrome (MS) and insulin resistance (IR). NAFLD is a collective term and includes a wide range of disorders, including nonalcoholic hepatic steatosis (NAS), nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which can

progress to fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (1). Metabolic manifestations of the disease are prominent in its early stages of development, and are directly associated with an increased risk of type 2 diabetes mellitus (DMt2) and cardiovascular disease (CVD), regardless of traditional risk factors (2,3).

The liver is a central regulator of systemic energy homeostasis and plays a key role in glucose and lipid metabolism. Moreover, the liver is recognized as an endocrine organ that produces and secretes a number of

specific proteins – hepatokines, which directly regulate systemic metabolism and energy homeostasis. Impaired gluconeogenesis and dyslipidemia are among the most common manifestations of NAFLD, with hepatokines secreted by the liver directly involved in these processes (4).

Fetuin-A, also known as alpha-2-Heremans-Schmid glycoprotein (64 kDa) is produced mainly by the liver. In humans, the Fetuin-A gene is located on chromosome 3q27, which has been identified as a suspected locus for DMt2 and MS (5). This multipotent hepatokine is involved in the regulation of bone metabolism, keratinocyte migration and control of proteolytic activity. It is also considered a biomarker of neurodegenerative diseases, as well as an inducer of IR, cardiovascular risk, endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis (6). Fetuin-A has been shown to be an inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase in the liver and skeletal muscle, which is associated with inhibition of autophosphorylation of tyrosine kinase at the insulin receptor and IRS-1, leading to IR (6). Elevated levels of saturated fatty acids by NF- κ B, as well as elevated blood sugar levels by ERK 1 and 2 activated signalling pathways, induce hepatic synthesis of fetuin-A (7). On the other hand, elevated plasma levels of fetuin-A in patients with NAFLD indicate its potential association with IR and hepatic steatosis, being considered an early marker and predictor of DMt2 (8).

Angiopoietin-related growth factor (AGF), also known as angiopoietin-bound protein 6, is encoded by the Angpt16 gene and secreted into the bloodstream after its formation in the liver (9). Serum concentrations of AGF were found to be significantly increased in patients with DMt2 and MS, with AGF positively correlated with markers of IR and negatively with HDL-cholesterol (10). Namkung et al. found elevated levels of AGF in patients with MS, and the authors suggested that patients with MS or DMt2 may be less sensitive to AGF (11). One theory of the mechanisms by which AGF affects glucose metabolism is that AGF inhibits glucose production in hepatocytes in a concentration-dependent manner by lowering glucose-6 phosphatase expression (11). In vitro analyses show reduced hepatic gluconeogenesis after treatment with AGF. Kitazawa et al. suggest that AGF can be considered a new therapeutic target for DMt2, obesity, MS, and NAS (12).

Sex hormone binding globulin (SHBG) is produced mainly by the liver. The main function of this hepatokine is the transport of sex hormones, and its circulating levels are associated with glucose metabolism, obesity, and other components of MS (13). Decreased SHBG levels were observed in postmenopausal women with histologically proven NAFLD compared to controls, with serum concentrations associated with NAFLD regardless of age, BMI and waist circumference (14). An association between decreased levels of this hepatokine and NAFLD has also been demonstrated in patients with DMt2 (15). It has also been found that

serum SHBG levels decrease with increasing intrahepatic fat content, and conversely, lifestyle changes and weight reduction lead to an increase in SHBG, which is directly related to improved hepatic steatosis (16).

The aim of the present study was to investigate the serum levels of the hepatokines Fetuin-A, AGF and SHBG and to assess their association with metabolic disorders and key indicators of micro- and macroangiopathy in obese patients and NAFLD.

Material and methods

The study included a total of 82 people studied at the Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases at the University Hospital „Alexandrovska“, MU, Sofia divided into the following main groups: *Group 1* – NAFLD with obesity without carbohydrate disorders 46 patients and *Group 2* – NAFLD with obesity and prediabetes 36 patients. The mean age of the participants was $50,6 \pm 10,5$ years between 32 and 72 years.

Including criteria: Age ≥ 18 years; Obesity (BMI ≥ 30 kg/m²; and/or waist >94 cm for men and >80 cm for women); Impaired fasting glucose (IFG-fasting plasma glucose equal to or higher than 5.6 mmol/l and lower than 7,0 mmol/l) and/or impaired carbohydrate tolerance (ICT - plasma glucose at 2 hours after oral glucose loading equal to or higher than 7,8 mmol/l but less than 11,1 mmol/l), HbA_{1c} $<6,5\%$ and $\geq 5,7\%$ (17); Ultrasound-based diagnosis of primary nonalcoholic steatosis; Signed informed consent.

Excluding criteria: Alcoholic liver disease; alcohol consumption > 20 g daily absolute alcohol for women and >30 g for men; Secondary non-alcoholic steatosis (hepatitis C, taking steatogenic drugs - amiodarone, methotrexate, tamoxifen, corticosteroids, congenital metabolic diseases); Advanced fibrosis and cirrhosis based on ELF test, NFS, APRI and FIB-4; Diabetes mellitus (fasting blood sugar $\geq 7,0$ mmol/l and/or accidental or 2 hours after OGTT $\geq 11,1$ mmol/l and/or HbA_{1c} $\geq 6,5\%$); Neoplastic diseases; Chronic kidney disease (chronic kidney disease eGFR <60 ml/min/1,73 m² calculated by CKD-EPI formula); NYHA class III-IV heart failure; Other endocrine diseases (Cushing's syndrome, acromegaly, hyper-/hypothyroidism, etc.); other concomitant diseases that would affect the results obtained.

The following investigations were performed:

Height (cm), weight (kg); Body mass index – BMI kg/m² (weight in kilograms divided by height in meters squared); Waist circumference – WC, measured in the middle of the distance between the costal arch and the iliac crest; Hip circumference (HC), measured at the level of the great trochanter; Waist-to-hip ratio (WHR); Waist-to-stature ratio (WSR); Body composition – assessed by bioimpedance analysis (Tanita, BC408, Japan) – body mass index (BMI), fat mass (Fat mass), percentage of fat tissue (Fat%), fat-free mass (Fat freemass); standard laboratory tests; abdominal ultrasound.

Specialized instrumental investigations: Measurement of intima media thickness of a.carotis com. (IMT). The measurement of IMT is a non-invasive ultrasound biomarker for early atherosclerosis. The Cardio Health Station system (Panasonic, Japan) performs automated assessment of IMT. Study for vasomotor dysfunction and as an indicator of the autonomic nervous system with a SudoScan device (Impeto Medical, Paris, France). SudoScan is a new method for rapid, non-invasive assessment and quantification of vascular function; *Ankle-Brachial Index (ABI) calculation:* ABI represents the relationship between systolic ankle pressure and brachial systolic pressure and provides information on the presence of peripheral arterial disease; *Study for the presence of peripheral neuropathy* – assessment of tactile (using a 10g monofilament), temperature (using a thermal discriminator) and vibrational sensation (using a 128Hz tuning fork and biotesiometer) and tendon-periosteal reflexes (using a neurological hammer) and calculating the risk of peripheral neuropathy (NDS). Vibration Perception Threshold (VPT) with Ultra Biotesiometer Meteda, USA). Normal vibration sensitivity (normal vibration threshold) <25V and > 25V impaired vibration sensitivity.

Serum hepatokine levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fetuin-A* (Human Fetuin A, ELISA kit, Bio Vendor, Czech Republic); *AGF* (Human Angiopoetin-related growth factor, ELISA Kit, Abbexa, UK); *Sex hormone binding globulin* (SHBG, ELISA kit, Dia Source, Belgium).

Statistical processing of the results was performed with the statistical package IBM SPSS Statistics 25,0. and Med Calc Version 14.8.1. The following methods were applied: χ^2 tests and Fisher's exact test; One-way analysis of variance ANOVA; Student's T-test; correlation analysis and nonparametric test of Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk. For a significance level at which the null hypothesis is rejected, $p < 0,05$ was assumed.

Table 1. Comparative analysis between the groups according to age and anthropometric parameters.

Parameters	Group 1 n =46		Group 2 n= 36		P
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
Age (years)	48,29	10,82	53,36	10,25	0,001
BMI (kg/m ²)	37,34	6,63	37,73	5,84	0,341
Waist (cm)	110,33	14,01	113,22	12,83	0,115
Hip (cm)	118,72	13,21	117,93	11,92	0,660
WHR	0,94	0,13	0,9	0,15	0,033
WSR	0,68	0,09	0,69	0,08	0,103
Fat tissue (%)	46,09	4,58	46,75	6,93	0,217

BMI, body mass index; WHR, Waist-to-hip ratio; WSR, waist-to-stature ratio; VAT, visceral adiposity tissue

Results

The comparative analysis of the studied groups by age and anthropometric indicators is presented in Table 1. A significant difference was found only in age and WHR, with significantly higher mean values in the group with prediabetes ($p=0,001$; $p=0,033$, respectively). As there is a statistically significant difference between the ages, the two study groups were previously statistically aligned on this indicator. The comparative analysis of the studied groups by blood pressure, lipid profile, blood glucose and insulin from OGTT at 0, 60 and 120 min, and HOMA-IR are presented in Table 2. The results of the analysis showed that between the groups with obesity without carbohydrate disorders and obesity with prediabetes a significant difference was

found in HDL, VLDL, TG, plasma glucose and insulin from OGTT and HOMA-IR. Significantly higher mean values in the prediabetes group were VLDL ($p<0,001$), TG ($p<0,001$), fasting plasma glucose and insulin from OGTT at each of the measurement points ($p<0,01$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,01$, $p=0,024$, $p<0,001$, respectively) and HOMA-IR ($p<0,01$). In the obese group alone, statistically significantly higher values were found for HDL-C ($p=0,008$).

The performed correlation analysis for the presence of association between the studied hepatokines Fetuin A, AGF and SHBG and the anthropometric parameters established a small number of correlations. A directly proportional correlation was found between AGF and waist /hip ratio ($p=0,255$), as well as an inversely proportional correlation between SHBG and waist circumference ($p=0,285$) and waist/hip ratio ($p=0,245$) (Table 3).

No significant difference was found between the studied parameters in the groups with and without prediabetes, as well as with the components of the metabolic syndrome (Table 2). Regarding the relationship between the studied hepatokines and the indicators of micro- and macroangiopathy, a weak correlation was found only between fetuin A and ABI ($p = 0,221$).

Discussion

NAFLD is a multisystem disease in which the regulation of many metabolic and inflammatory pathways is disrupted, playing an important role in the development of both CVD and DMt2, with hepatokines directly involved in these processes.

Fetuin-A has been identified as an endogenous inhibitor of insulin receptor tyrosine kinase in the liver and skeletal muscle of rodents, and its deficiency in mice has shown improved insulin sensitivity, suggesting that Fetuin-A plays a major role in regulating insulin signalling (6). There is evidence of an associ-

Table 2. Comparative analysis between the groups according to arterial pressure and metabolic parameters.

Parameters	Group 1 n =46		Group 2 n= 36		P
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	
SBP (mmHg)	132,07	16,22	135,21	15,80	0,149
DBP (mmHg)	85,63	10,02	85,18	10,25	0,145
Total Cholesterol (mmol/l)	5,18	1,02	5,28	0,98	0,329
HDL (mmol/l)	1,32	0,33	1,18	0,28	0,008
LDL (mmol/l)	3,22	0,89	3,17	0,93	0,699
VLDL (mmol/l)	0,65	0,28	0,89	0,31	<0,001
TG (mmol/l)	1,48	0,81	2,13	1,00	<0,001
Glu 0 (mmol/l)	5,33	0,52	6,94	2,69	<0,001
Glu 60 (mmol/l)	8,43	2,31	11,22	2,50	<0,001
Glu 120 (mmol/l)	5,48	1,48	8,65	2,31	<0,001
Insulin 0 (mU/L)	15,12	8,66	25,26	29,26	<0,001
Insulin 60 (mU/L)	107,12	67,83	136,77	105,68	0,024
Insulin 120 (mU/L)	53,43	42,81	123,88	136,34	<0,001
HOMA-IR	3,78	2,20	7,25	8,40	<0,001
Fetuin A (pg/ml)	717,03	181,84	661,43	148,26	0,141
AGF (mcg/ml)	8,55	1,70	8,15	1,69	0,293
SHBG (nmol/l)	49,85	28,12	43,89	19,48	0,604

SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HDL, high density lipoproteins; LDL, low density lipoproteins; VLDL, very low density lipoproteins; TG, triglycerides; Glu0, glucose at the zero minute; Glu 60, glucose at the sixtieth minute; Glu120, glucose at the one hundred and twentieth minute; Insulin0, insulin at the zero minute; Insulin 60, insulin at the sixtieth minute; Insulin120, insulin at the one hundred and twentieth minute; HOMA-IR, Homeostatic model assessment of insulin resistance

ation between Fetuin-A, obesity, IR and NAFLD (5, 18). Several studies have demonstrated higher levels of Fetuin-A in patients with histologically confirmed NAFLD (19). In our study, we found no difference in Fetuin-A levels in the two main groups, nor an association with carbohydrate disorders. No difference in levels was found in patients with and without MS, with and without IR. There is evidence of an association of Fetuin-A with CVD, despite known risk factors such as hypertension and smoking, with elevated levels associated with an increased risk of myocardial infarction and stroke (20). We analysed Fetuin-A within the indicators for micro- and macroangiopathy (ABI, IMT, NDS and VPT), where a weak correlation with ABI was found.

AGF is secreted primarily by the liver and was identified by Oike et al. in 2003 (9). The authors found that in experimental mouse models, low levels of AGF were associated with obesity, IR, and lipid accumulation in the liver and skeletal muscle. This hepatokine is thought to have an important function in lipid and carbohydrate metabolism and is probably a protein that reduces IR and obesity (21). Ebert et al. found that serum AGF concentrations were significantly elevated in patients with DMt2 compared with non-diabetics (10). In our study, we did not find a difference in AGF levels in the two main groups, as well as an association with carbohydrate disorders. There is evidence in the literature of elevated AGF levels in patients with MS compared to controls, and that MS is a predictor of serum levels (22). We found no difference in levels in patients with and without MS and with and without IR.

We did not find correlations with the indicators of the lipid profile and liver enzymes. From the anthropometric parameters, a correlation was found between AGF and the waist / hip ratio. From the analysis we performed on AGF within the indicators for micro- and macroangiopathy, no correlations were found. In vitro studies have shown a reduction in hepatic glucose production after treatment with AGF, indicating that it may be used as a new therapeutic target in patients with DMt2, obesity, MS, and NAFLD (12).

SHBG, which is produced mainly by the liver and whose main role is related to the transport of sex hormones, has a number of other functions. It is associated with glucose metabolism, obesity and MS (23). A study in postmenopausal women with histologically proven NAFLD found lower levels than controls, regardless of age, BMI and waist circumference (14). Decreased SHBG levels have also been found in patients with DMt2 and NAFLD (15). In our study, we found no difference in SHBG levels in the two main groups, as well as an association with carbohydrate disorders. We found an inversely correlated correlation with waist circumference, waist/hip ratio, and with insulin at 60th min. during OGTT. Some studies report a decrease in SHBG serum concentrations with increasing liver fat content, and that lifestyle changes and weight loss lead to an increase in serum levels (16). We did not find a connection with MS and its components, as well as with IR. No difference was also found in patients with and without menopause.

The results obtained for Fetuin-A, AGF and SHBG were probably dictated by the relatively close metabolic characteristics of the main groups of patients in the study, with all participants being obese and NAFLD, which may be a stronger predictor of these hepatokines than with carbohydrate disorders and MS in general.

Table 3. Coefficients of correlation between the studied hepatokines and anthropometric parameters.

Parameters	Fetuin A	AGF	SHBG
Age	-0,015	0,057	0,181
BMI	-0,146	-0,136	-0,217
Waist	-0,023	0,087	-0,285*
Hip	-0,154	-0,194	-0,042
WHR	0,037	0,255*	-0,245*
WSR	-0,043	-0,013	-0,212
VAI	0,030	0,020	0,021
Fat %	-0,248	-0,322	0,032

* - $p < 0,05$

BMI, body mass index; WHR, waist-to-hip ratio; WSR, waist-to-stature ratio; VAI, visceral adiposity index

Future studies involving different groups of individuals are needed to clarify and understand the role of these hepatokines in the pathogenesis of NAFLD and their relationship to metabolic disorders.

In conclusion, levels of Fetuin-A, AGF and SHBG are not affected by carbohydrate disorders and metabolic syndrome in obese patients and NAFLD. The studied hepatokines did not affect the parameters of micro- and macroangiopathy.

References

1. Leoni S, Tovoli F, Napoli L, Serio I, Ferri S, Bolondi L. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol* 2018; 24: 3361–3373.
2. Athyros V, Tziomalos K, Katsiki N, Doulas M, Karagiannis A, Mikhailidis D. Cardiovascular risk across the histological spectrum and the clinical manifestations of non-alcoholic fatty liver disease: an update. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 6820–6834.
3. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed B, Pietka T, Abumrad N, Patterson B, et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 15430–15435.
4. Iroz A, Couty J, Postic C. Hepatokines: unlocking the multi-organ network in metabolic diseases. *Diabetologia* 2015; 58: 1699–1703.
5. Mori K, Emoto M, Yokoyama H, Araki T, Teramura M, Koyama H, et al. Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type-2 diabetic and nondiabetic subject. *Diabetes Care* 2006; 29: 468.
6. Yilmaz Y, Yonal O, Kurt R, Ari F, Oral AY, et al. Serum fetuin A/alpha2HS-glycoprotein levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease: relation with liver fibrosis. *Ann Clin Biochem* 2010; 47: 549–553.
7. Dasgupta S, Bhattacharya S, Biswas A, Majumdar SS, Mukhopadhyay S, Ray S, Bhatta-Charya S. NF- κ B mediates lipid-induced fetuin-A expression in hepatocytes that impairs adipocyte function effecting insulin resistance. *Biochem J* 2010; 429: 451–462.
8. Stefan N, Schick F, Haring H-U. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *N End J Med* 2014; 371: 2236–2237.
9. Oike Y, Kasunaga K, Ito Y, Matsumoto S, Maekawa H, Arai F, et al. Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling and regeneration. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 9494–9499.
10. Ebert T, Bachmann A, Lossner U, Kratzsch J, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M. Serum levels of angiopoietin-related growth factor in diabetes mellitus and chronic hemodialysis. *Metabolism* 2009; 58: 547–551.
11. Namkung J, Koh SB, Kong ID, Choi J-W, Yeh B-I. Serum levels of angiopoietin-related growth factor are increased in metabolic syndrome. *Metabolism* 2011; 60: 564–568.
12. Kitazawa M, Ohizumi Y, Oike Y, Hishinua T, Hashimoto S. Angiopoietin-related growth factor suppresses gluconeogenesis through the Akt/Forkhead box class 01-dependent pathway in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 323: 787–790.
13. Peter A, Kantartzis K, Machann J, Schick F, Staiger H, Machicao F, et al. Relationship of circulation sex-hormone-binding globulin with metabolic traits in humans. *Diabetes* 2010; 59: 3167–3173.
14. Polyzos SA, Kountouras J, Tsatsoulis A, Zafeiriadou E, Katsiki E, Patsiaoura K, et al. Sex steroids and sex hormone-binding globulin in postmenopausal women with nonalcoholic fatty liver disease. *Hormones (Athens)* 2013; 12: 405–416.
15. Hua X, Sun Y, Zhong Y, Feng W, Huang H, Wang W, et al. Low serum sex hormone-binding globulin is associated with nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014; 80: 877–888.
16. Stefan N, Schick F, Haring H-U. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2009; 361: 2675–2676.
17. American Diabetes Association. Standards Of Medical Care In Diabetes-2019 Abridged For Primary Care Providers. *Clin Diabetes* 2021; 37: 11–34.
18. Dogru T, Genc H, Tapan S, Aslan F, Ercin CN, Ors F, et al. Plasma fetuin A is associated with endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013; 78: 712–717.
19. Haukeland JW, Dahl TB, Yndestad A, Gladhaug IP, Loberg EM, Haaland T, et al. Fetuin A in nonalcoholic fatty liver disease: in vivo and in vitro studies. *Eur J Endocrinol* 2012; 166: 503–510.
20. Aroner S, St-Julesa D, Mukamal K, Katz R, Shlipak MG, Criqui MH, et al. Fetuin-A, glycemic status, and risk of cardiovascular disease: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2016; 248: 224–229.
21. Hui E, Xu A, Yang HB, Lam KSL. Obesity as the common soil of non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: role of adipokines. *J Diabetes Investig* 2013; 4: 413–425.
22. Namkung J, Koh SB, Kong ID, Choi J-W, Yeh B-I. Serum levels of angiopoietin-related growth factor are increased in metabolic syndrome. *Metabolism* 2011; 60: 564–568.
23. Lazo M, Zeb I, Nasir K, Tracy RP, Budoff MJ, Ouyang P, Vaidya D. Association between endogenous sex hormones and liver fat in a multiethnic study of atherosclerosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13: 1686–1693.

Изследване на връзката между хиперандрогенизма при синдром на поликистозни яйчници и клинични данни за ранна гонартроза

Кабакчиева, Пламена П.^{1,2}, Гатева, Антоанета Т.¹, Георгиев, Цветослав А.³, Каменов, Здравко А.¹

¹ Клиника по Ендокринология, УМБАЛ „Александровска“, Катедра по Вътрешни болести, Медицински факултет, Медицински университет, София,

² Клиника по Вътрешни болести, Военноморска болница, Варна, Военномедицинска академия, Варна,

³ Клиника по Ревматология, УМБАЛ „Св. Марина“, Първа катедра по вътрешни болести, Медицински факултет, Медицински университет, Варна, България

Адрес за кореспонденция:

Д-р Пламена Кабакчиева,
Клиника по Ендокринология, УМБАЛ „Александровска“,
Катедра по Вътрешни болести, МФ, МУ, София
бул. „Св. Г. Софийски“ №1;1606 София, България
e-mail: plamenakabakchieva@yahoo.com

Постъпване: 26. 08. 2021г.

Ревизиране: 30. 08. 2021г.

Приемане: 31. 08. 2021г.

Резюме

Въведение: Целта на проучването е да анализираме клиничните данни за ранна гонартроза, оценени посредством Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) въпросник, сред пациентки със синдром на поликистозни яйчници (СПЯ) и здрави доброволци и тяхната връзка с хиперандрогенизма при СПЯ.

Методи: В изследването са включени 54 пациентки със СПЯ, които съответстват на фенотипове А, В и С съгласно Ротердамските критерии. Те са сравнени с 26 здрави контроли, съответстващи по възраст и ИТМ. Подробни антропометрични измервания, лабораторни изследвания и клинична оценка за хиперандрогенизма са извършени при всички участнички, които също така попълниха KOOS въпросник.

Резултати: Жените със СПЯ имат по-често симптоми, свързани с колянната става ($p=0,035$) и по-изразени нарушения в ежедневните дейности ($p=0,001$), отколкото контролите. По отношение на домайните – болка в коляното, качеството на живот и спорт и почивка групите не се различават значимо. Групата със СПЯ показва по-високи нива на общ тестостерон, ДХЕАС, андростендион (всяко $p<0,001$), FAI ($p=0,002$) и повишено съотношение ЛХ/ФСХ ($p=0,035$). СПЯ жените със затлъстяване съобщават по-често за влошени ежедневни активности спрямо тези с нормално и наднормено тегло ($p=0,035$). Сигнификантни корелации се наблюдават в СПЯ групата между домайните – болка, симптоми, ежедневни активности и спорт и почивка и теглото, талията и талия/ханш отношението. Половите хормони не корелират с никой от оценяваните KOOS домайни.

Заключение: Симптомите, свързани с коляното и нарушенията в ежедневните активности, са по-изразени сред жените със СПЯ, спрямо здравите контроли. Абдоминалният тип затлъстяване може допълнително да допринесе за свързаната с коляното дисфункция в ежедневните дейности, докато хиперандрогенизмът не показва връзка с оплакванията в коляното в нашето проучване.

Ключови думи: синдром на поликистозни яйчници; хиперандрогенизъм; пациент-докладвани измервания; гонартроза

Въведение

Синдромът на поликистозни яйчници (СПЯ) е най-честото ендокринно-метаболично нарушение и водеща причина за хиперандрогенизъм

и менструални смущения сред младите жени (1). Според широко утвърдените и общоприети Ротердамски диагностични критерии на European Society for Human Reproduction and Embryology/American Society of Reproductive Medicine (ESHRE-

ASRM), хиперандрогенизмът (ХА) в съчетание с другите два диагностични критерия: олиго-ановулация и поликистозна морфология на яйчниците (ПКМЯ) обособяват четири СПЯ фенотипа: фенотип А включва и трите диагностични критерия; фенотип В включва само ХА и олиго-ановулация, без ПКМЯ; фенотип С (ХА и ПКМЯ) и фенотип D включва само олиго-ановулация и ПКМЯ, без ХА (2).

Затлъстяването и инсулиновата резистентност са често срещани метаболитни нарушения сред жените със СПЯ (1). Свързаните с тях изменения в липидната, белтъчната и аминокиселинната обмяна, нискостепенно възпаление и оксидативен стрес (3) увеличават неколккратно риска от изява на захарен диабет тип 2, метаболитен синдром и сърдечно съдови заболявания у жените със СПЯ (4, 5). В проучване сред българска популация жени със СПЯ инсулиновата резистентност и метаболитните нарушения са били по-често сред т.нар. класически фенотипове СПЯ (фенотип А и В), при които и хиперандрогенизмът е бил най-силно изразен (6).

Малко изследвана е връзката между СПЯ и остеоартрозата (ОА), която е най-разпространеното хронично ставно заболяване (7). Причината да се предполага и търси асоциация между двете състояния е фактът, че нарушението в баланса на половите хормони играе ключова роля в патогенезата както на СПЯ, така и на ОА. Все повече доказателства сочат, че ОА и свързаното с него разграждане на хрущяла са тясно свързани с възрастните промени в половите хормони (8, 9). Доказателство за ролята на хормоналните промени в патогенезата на ОА е фактът, че повечето жени проявяват симптоматика типична за артроза на коляното (КОА) в ранна постменопаузална възраст (10). Стесняването на ставното пространство на коляната става при жените се свързва със спада на естрогеновите нива, наблюдаващ се след навлизане в менопаузална възраст (11). Извеждането на хипоестринизма като основен рисков фактор за ОА при жените, доведе до обособяването на специфичен подтип на заболяването т. нар. „хормонално зависима“ ОА (12). Малко проучена и изследвана все още е ролята на хиперандрогенизма в патогенезата на ОА, като друго често хормонално нарушение у жената.

Нашето проучване има за цел да анализира връзката между СПЯ и ОА посредством оценка на ранни клинични прояви за КОА чрез въпросник Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) при пациентки със СПЯ и здрави доброволци, както и тяхната връзка с клиничните и лабораторни характеристики на хиперандрогенизма при синдрома.

Материали и методи

Пациентки и контроли

В изследването са включени 54 жени, диагностицирани според Ротердамските критерии със СПЯ (2), които са с клинични и/или биохимични данни за хиперандрогенизмът, съответно фенотип А, В и С.

Пациентките със СПЯ са сравнени с 26 здрави контроли. Всички участнички в изследването са подложени на цялостна диагностична оценка, включваща анамнеза, попълване на въпросник, клиничен преглед, лабораторни и хормонални изследвания.

Изключващите критерии на проучването са: наличие на възпалително/автоимунно ревматично заболяване и/или друго ендокринно разстройство като заболяване на щитовидната жлеза, хиперпролактинемия, преждевременна овариална недостатъчност, хипоталамична аменорея, вродена надбъбречна хиперплазия, андроген-продуциращи тумори, синдром или болест на Cushing. Участнички, използващи системни кортикостероиди, комбинирани орални контрацептиви, антиандрогени или инсулинови очувствители (метформин, тиазолидиндиони) през последните 3 месеца, са изключени от изследването. Бременни жени и професионални спортистки също не са обект на това проучване.

Проучването е одобрено от етична комисия на Медицински Университет, София с протокол № 05 от 28. 02. 2020 г.

Антропометрични измервания и въпросници

След подписване на писмено информирано съгласие се извърши подробно антропометрично изследване на всички участнички, включващо следните параметри: ръст, тегло, индекс на телесна маса (ИТМ), обиколка на талията и ханша и изчисляване на талия/ханш (Т/Х) отношение. ИТМ се изчисли по формулата: теглото разделено на два пъти височината (kg/m^2). Талията се измери в хоризонтална равнина по средата между върха на горния илиачен гребен и долния ръб на последното ребро в средноаксиларна линия, докато ханшът се измери на нивото на големия трохантер. Т/Х отношението се изчисли като обиколката на талията се раздели на тази на ханша. Всички антропометрични измервания са направени от един лекар.

Допълнително всички участнички в изследването попълниха международно утвърден въпросник за оценка на колянна става сред млади и физически активни хора – KOOS. Чрез него се проведе оценка в двете изследвани групи на следните, свързани с колянната става, показатели: болка, симптоми, качеството на живот,

ежедневни дейности и спортна функция. Въпросникът съдържа скала на Likert и всички елементи имат пет възможни опции за отговор, отбелязани от 0 (без проблеми) до 4 (екстремни проблеми) и всеки от петте резултата се изчислява като сума от включените елементи. Резултатите се трансформират в скала 0–100, като нула съответства на най-тежките, докладвани от пациента нарушения с коляното, а 100 съответства на липса на проблеми с коляното. Резултатите между 0 и 100 представляват процента от общия възможен постигнат резултат. Общият резултат не се изчислява, тъй като се счита за желателно да се анализират и интерпретират отделно петте домейна.

Лабораторни изследвания

Посредством стандартна венепункция се взе кръв на гладно от всички участнички между 3-ти и 5-ти ден на спонтанен менструален цикъл или предизвикано от гестаген менструално кървене. Пробите незабавно се обработват за измерване на плазмена глюкоза на гладно (ПГГ), серумен имунореактивен инсулин (ИРИ), общ тестостерон, дехидроепиандростерон сулфат (ДХЕАС), андростендион, секс-хормон свързващ глобулин (СХСГ), лутеинизиращ хормон (ЛХ), фоликулостимулиращ хормон (ФСХ) и естрадиол. Индексът на свободен андроген (free androgen index, FAI) се изчислява, като се използва следното уравнение: $FAI = \text{тестостерон (pmol/L)} / \text{СХСГ (pmol/L)} \times 100$. Хомеостатичният модел за оценка на инсулинова резистентност (homeostatic model assessment of insulin resistance, HOMA-IR) се изчислява по формулата: $HOMA-IR = \text{ПГГ} \times \text{ИРИ на гладно} / 22,5$. Всички хормонални и биохимични изследвания се извършват в Клиничната лаборатория на УМБАЛ „Александровска“.

Признаци на хиперандрогенизъм

Хиперандрогенизъм е потвърден при наличие на клинични характеристики и/или повишени нива на андрогените (общ тестостерон $\geq 1,6$ pmol/L) и/или FAI ≥ 5) (13). Един ендокринолог извърши клиничното изследване за хиперандрогенизъм посредством оценка наличието на хирзутизъм, акне и/или алопеция. Хирзутизмът е оценен с помощта на модифицираната скала за оценка на Ferriman Gallwey [mFG score] (14), като при наличие на 8 или повече точки се потвърди присъствието му (15). Алопецията се оцени с помощта на визуалната скала на Лудвиг (16).

Статистика

Статистическите анализи са извършени с помощта на SPSS IBM статистически софтуер v21.0 и GraphPad Prism v8.4. Първоначално се проведе дескриптивна статистика, при която разпределението на данните се оцени с тест на

Shapiro–Wilk. Връзката между категориите величини се анализира с Chi квадрат тест. Параметрични тестове (независим T-Test и корелация на Pearson) са използвани в случай на нормално разпределение на данните и в тези случаи хипотезите са изложени като отношение на разликата между средните стойности ($\text{means} \pm \text{SD}$). За оценка на корелациите на неправилно разпределените данни се използва корелация на Spearman. Неправилно разпределените данни са сравнени с непараметричния U-тест на Mann-Whitney. Тест на Levene за равенство на вариациите се извърши, за да се оцени хомогенността на дисперсията. Когато данните са разпределени по pogodен начин, хипотезите са изложени като отношение на разликата между медианите (interquartile range [IQR]). Нивото на значимост е 0,05.

Резултати

Демографски, антропометрични, клинични и хормонални характеристики на групите

Жените със СПЯ и контролите не се различават значимо по възраст и ИТМ. Двете групи показват сходни резултати и при анализа на останалите антропометрични параметри като височина, тегло, талия, ханш и Т/Х отношение. Хирзутизмът е значително по-изразен сред пациентките със СПЯ спрямо здравите контроли, оценен чрез mFG score ($p = 0,001$), докато акнето и алопецията са сходно представени сред двете групи. Групата със СПЯ показва по-високи нива на общ тестостерон, ДХЕАС, андростендион (всяко $p < 0,001$), FAI ($p = 0,002$) и повишено съотношение ЛХ/ФСХ ($p = 0,035$). Съответните демографски, антропометрични, клинични, биохимични и хормонални характеристики на пациентите със СПЯ и контролите са представени в Таблица 1.

Сравнения на петте домейна на KOOS въпросника в групите

Жените със СПЯ и здравите доброволци показват сходни резултати при оценяване на отделните домейни на KOOS въпросника – болки в коляното, качество на живот, спорт и почивка. Симптомите, свързани с коляното, са значително по-изразени сред пациентската група отколкото при контролната група ($p = 0,035$). Свързаните с коляната става ежедневни активности са по-нарушени сред пациентите спрямо контролите ($p = 0,001$). Фигура 1 онагледява сравненията на изследваните параметри, свързани с коляното между СПЯ пациенти и здрави контроли. Отчетливо жените със затлъстяване в пациентската група показват по-лоши резултати при оценка на домейна ежедневни активности, спрямо пациентите с нормално и наднормено тегло ($p = 0,035$). При останалите

Таблица 1. Демографски, антропометрични, клинични, биохимични и хормонални характеристики на пациентките със СПЯ и здравите контроли.

Параметри	Жени със СПЯ (n = 54)	Здравите жени (n = 26)	p value
<i>Демографски и антропометрични характеристики</i>			
Възраст (години)	25,9 (± 5,3)	27,9 (± 5,1)	NS
Тегло (кг)	74,2 (± 20,4)	76,9 (± 19)	NS
Височина (см)	163 (± 7)	164 (± 5,3)	NS
ИТМ (кг/м ²)	27,5 (21; 33,1)	25,6 (22,5; 37,9)	NS
Талия (см)	83,5 (76; 101,3)	85,5 (74; 96,8)	NS
Ханш (см)	100 (92; 110)	102 (94,5; 110,3)	NS
Т/Х отношение	0,84 (0,78; 0,97)	0,81 (0,77; 0,91)	NS
<i>Хормонални, метаболитни и биохимични характеристики</i>			
ПГГ (mmol/L)	5,0 (4,7; 5,3)	5,1 (4,9; 5,3)	NS
ИРИ на гладно (mU/L)	9,6 (5,9; 16,8)	9,3 (6,2; 14,4)	NS
НОМА-IR	2,3 (1,3; 3,7)	2,2 (1,3; 3,3)	NS
ЛХ (mU/mL)	7,64 (± 4,49)	6,19 (± 2,47)	NS
ФСХ (mU/mL)	5,2 (± 1,32)	5,54 (± 1,33)	NS
ЛХ/ФСХ отношение	1,49 (± 0,81)	1,11 (± 0,36)	0,035
Естрадиол (pmol/L)	130,5 (95,5;183)	147,2 (99,5;184,6)	NS
ДХЕАС (mcmol/L)	9,3 (6,5; 11,6)	5,5 (4,2; 7,3)	< 0,001
Андростендион (ng/mL)	4,49 (± 2,12)	2,27 (± 0,94)	< 0,001
СХСГ (nmol/L)	42 (28,6; 74,3)	54 (28,3; 79)	NS
<i>Биохимични признаци на хиперандрогенизъм</i>			
Общ тестостерон (nmol/L)	1,65 (± 0,73)	0,91 (± 0,34)	< 0,001
FAI	3,37 (1,8; 6,8)	1,51 (1,1; 3,1)	0,002
<i>Клинични признаци на хиперандрогенизъм</i>			
mFG score	8 (4; 14)	3 (0,8; 6,3)	0,001
Акне	13/54	4/26	NS
Алопеция	1/54	0/26	NS

ДХЕАС – дехидроепиандростерон сулфат;
ИТМ – индекс на телесна маса;
ЛХ – лутеинизиращ хормон;
СПЯ – синдром на поликистозни яйчници;
СХСГ – свързващ половите хормони глобулин;
Т/Х – талия/ханш отношение;
ФСХ – фоликулостимулиращ хормон;
НОМА-IR – хомеостатичен модел за оценка на инсулинова резистентност;
mFG score – модифицирана скала за оценка на хирзутизъм на Ferriman Gallwey;
NS – липса на сигнификантност;
FAI – свободен андрогенен индекс.

Нормално разпределените данни са представени посредством mean (± SD). Неправилно разпределените данни са представени посредством median (IQR). Категорийните величини са представени като пропорция от общия брой (n/N).

домейни от KOOS въпросника подобна зависимост не се наблюдава (Фиг. 1).

Корелации между отделните домейни на KOOS в групата на жените със СПЯ

Слаби негативни корелации се наблюдават между KOOS болка, симптоми, ежедневни дейности и спорт и почивка и антропометричните показатели – тегло, обиколка на талията и Т/Х отношение, представени в Таблица 2. Единствено KOOS качество на живот не показва сигнификантна корелация с изследваните клинични, антропометрични, хормонални и биохимични параметри. Биохимичните и клинични признаци на хиперандрогенизма не корелират с никой от домейните на KOOS (Табл. 2).

Обсъждане

Хормоналният дисбаланс играе роля в етиопатогенезата на ОА (12). Спадът на естрогеновите нива, настъпващ в менопаузална възраст, се свързва със стесняване на ставната междина (11) и съответно акцелериране на процесите на ОА. Вероятно това обуславя обичайната почестата изява на ставната симптоматика в ранна постменопаузална възраст (10). Много по-малко изследвана и непозната остава ролята на хиперандрогенизма при жената в патогенезата на ОА. Добре известно е при мъжете, че андрогените имат протективен ефект върху ставния

Таблица 2. Корелации между домейните на KOOS въпросника и антропометричните показатели.

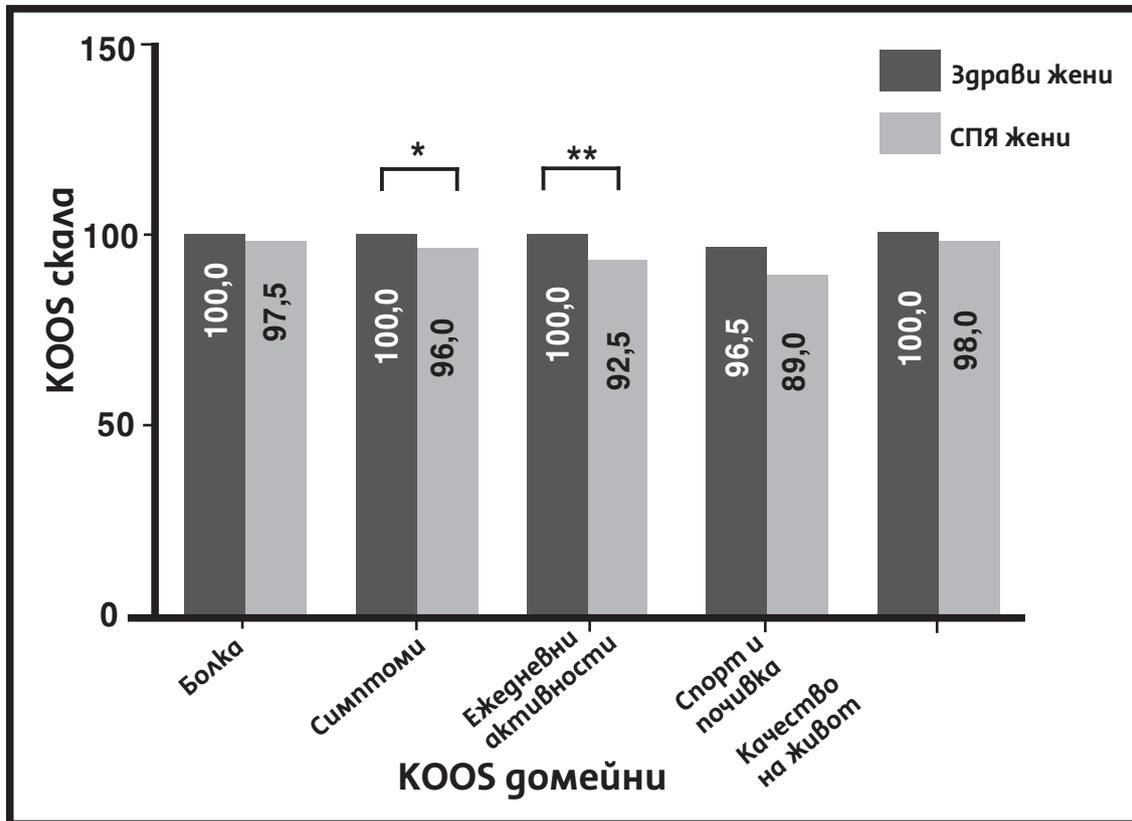
Параметър	KOOS болка	KOOS симптоми	KOOS ежедневни активности	KOOS спорт и почивка	KOOS качество на живот
Тегло (кг)	NS	NS	r = -0,304 p = 0,025	r = -0,289 p = 0,034	NS
Талия (см)	NS	NS	r = -0,344 p = 0,011	r = -0,328 p = 0,016	NS
Т/Х отношение	r = -0,290 p = 0,033	r = -0,296 p = 0,030	r = -0,321 p = 0,018	r = -0,334 p = 0,014	NS

Т/Х – талия/ханш отношение; KOOS - Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score;
NS – липса на сигнификантност.

Корелация на Pearson се използва в случай на нормално разпределение на данните. Корелация на Spearman се използва за оценка на неправилно разпределените данни.

Фигура 1.

Сравнение на отделните KOOS домейни между пациентите със СПЯ и здравите контроли.



СПЯ – синдром на поликистозни яйчници;

KOOS – Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score * p = 0,035; ** p = 0,001

хрущял (17). Но гали хиперандрогенизмът при жените има протективен ефект или увеличава риска от поява и развитие на ОА е все още спорен въпрос. Предполага се, че хиперандрогенизмът може би допринася за задебеляването на ставния хрущял, наблюдавано в проучвания, проведени сред жени със синдрома (18-20). И докато изтъняването на хрущяла е патогномоничен белег за ОА, задебеляването му има все още неизвестна значимост. Проучвания сочат, че нарастването на височината на хиалинния хрущял може също да означава влошаване на тъканите в най-ранните стадии на ОА (21, 22). Изследването на ранната болка и скованост и оценката на ежедневната активност и качество на живот, свързани с прояви от колянната става при млади жени със СПЯ, може да идентифицира тези с висок риск за ОА. Освен това, диагностицирането на ОА в най-ранния молекулярен стадий на „пре-остеоартроза“ може да осигури максимална полза от бъдещото лечение (23, 24). Нашето едномоментно проучване цели да идентифицира риска за бъдеща ОА при жени със СПЯ, сравнявайки ги със здрави доброволци, като оцени ранните клинични прояви на ОА на колянна става посредством утвърден въпросник, разработен за оценка на свързаните с колянната става нарушения сред млади и физически активни хора. Допълнително, изследването има за цел да анализира връзката на резултатите от KOOS с клиничните и лабораторни характеристики на хиперандрогенизма.

Пациентките със СПЯ в нашето проучване са със значимо по-изразен хирзутизъм от контролите, както и нивата на всички изследвани андрогени са сигнификантно по-високи сред тях. Анализът на резултатите от KOOS въпросника показват, че жените със СПЯ изпитват по-често симптоми, свързани с колянната става, и нарушения в ежедневните дейности, отколкото здравите доброволци. Това не може да се обясни изцяло със затлъстяването и свързаното с него по-голямо натоварване на колянното, тъй като контролите имат подобни демографски и антропометрични характеристики, включително ИТМ.

Наскоро, широкомащабно проучване разкри по-голямо разпространение и ускорена поява на ОА както при затлъстели, така и при пациентки със СПЯ без затлъстяване (25). Нашите данни потвърждават, че затлъстяването играе роля в изявата на ставните нарушения, но това по-скоро важи за нарушенията в ежедневните активности, отколкото за изявата на ставна симптоматика. Без съмнение абдоминалният тип затлъстяване, изразяващ се повишена обиколка на талия и повишено отношение Т/Х, оказва негативно влияние върху появата на ставна симп-

томатика, болка и свързаните с колянната става нарушения в ежедневните дейности и спорт и почивка. Интересно е, че клиничните или биохимични признаци на хиперандрогенизма не влияят върху резултатите от KOOS въпросника. Допълнително, домейните – болка в колянната става и свързаните с нея качество на живот и спорт и почивка, не показват съществена разлика между пациентки и контроли. Независимо от това можем да обобщим, че диагнозата СПЯ се асоциира по-често със ставни оплаквания и свързани с колянното нарушения в ежедневните дейности, при които покачването на телесното тегло и обиколката на талията допълнително оказват негативно влияние, докато хиперандрогенизмът има по-несъществено влияние. При анализа на данните се взема под внимание факта, че лошото самочувствие и психологическите особености сред жените със СПЯ (26) е възможно отчасти да обяснят резултатите от KOOS въпросника. Мащабни проспективни проучвания са необходими, за да потвърди нашата хипотеза и да се анализира причинно-следствената връзка между СПЯ и оплакванията, свързани с колянното.

Сред известните ограничения в нашето проучване са малкият брой на изследваните жени и крос-секционният дизайн на изследването, което е по-скоро изследователско и има за цел да постави основите за мащабни проспективни проучвания, които ще ни позволят да оценим причинно-следствената връзка на хиперандрогенизма и КОА.

Заклучение

Симптомите, свързани с колянното и нарушенията в ежедневните активности са по-изразени сред жените със СПЯ, отколкото при съответстващите им по възраст и ИТМ здрави контроли. Абдоминалният тип затлъстяване може допълнително да допринесе за свързаната с колянното дисфункция в ежедневните дейности, докато хиперандрогенизмът не показва никаква връзка с оплакванията в колянното в нашето проучване.

Evaluation of the Relationship Between Hyperandrogenism in Polycystic Ovary Syndrome and Clinical Data for an Early Stage of Knee Osteoarthritis

Kabakchieva, Plamena P.^{1,2}, Gateva, Antoaneta T.¹, Georgiev, Tsvetoslav A.³, Kamenov, Zdravko A.¹

¹ Department of Endocrinology, „Alexandrovska“, University Hospital, Department of Internal Medicine, Medical University, Sofia,

² Clinic of Internal Diseases, Naval Hospital, Varna, Military Medical Academy, Varna

³ Clinic of Rheumatology, „St. Marina“ University Hospital, First Department of Internal Medicine, Medical Faculty, Medical University, Varna, Bulgaria

Address for correspondence:

Plamena Kabakchieva,
Clinic of Endocrinology, „Alexandrovska“ University Hospital,
Department of Internal Medicine, MF, MU-Sofia
1, „Georgi Sofiyski“ Blvd, 1606 Sofia, Bulgaria
e-mail: plamenakabakchieva@yahoo.com

Submitted: 26. 08. 2021

Revised: 30. 08. 2021

Accepted: 31. 08. 2021

Abstract

Introduction: The study aimed to analyze clinical data for early-stage knee osteoarthritis, assessed by the Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) questionnaire among patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and healthy volunteers and to examine their relationship with hyperandrogenism in PCOS.

Methods: The study included 54 patients with PCOS who were phenotyped A, B, and C according to the Rotterdam criteria. They were compared with 26 healthy controls matched by age and BMI. Detailed anthropometric measurements, laboratory tests, and clinical assessment of hyperandrogenism were performed in all participants who also filled in the KOOS questionnaire.

Results: Women with PCOS were more likely to have knee-related symptoms ($p=0,035$) and disturbances in daily activities ($p=0,001$) than the controls. Regarding the domains – knee pain, quality of life, and sport function the groups did not differ significantly. The PCOS group showed higher levels of total testosterone, DHEAS, androstenedione (each $p<0,001$), FAI ($p=0,002$), and increased LH/FSH ratio ($p=0,035$). Obese PCOS women more frequently reported worsening of daily activities than normal and overweight patients ($p=0,035$). Significant correlations were observed in the PCOS group between the domains – pain, symptoms, daily activities and sport and recreation, and weight, waist circumference, and waist/hip ratio. Sex hormones did not correlate with any of the evaluated KOOS domains.

Conclusion: Knee-related symptoms and disturbances in daily activities were more common in women with PCOS than in the controls. Abdominal obesity may further contribute to knee-related dysfunction in daily activities, while hyperandrogenism showed no association with knee complaints in our study.

Key words: polycystic ovary syndrome; hyperandrogenism; patient-reported outcome measures; knee osteoarthritis

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine-metabolic disorder among young women and a major cause of hyperandrogenism and menstrual disturbances (1). According to the Rotterdam diagnostic criteria of the European Society for Human Reproduction and Embryology/American Society of Reproductive Medicine (ESHRE-ASRM), hyperandrogenism (HA) in combination with two other diagnostic

criteria: oligo-anovulation and polycystic ovarian morphology (PCOM) differentiate four PCOS phenotypes: phenotype A includes all three diagnostic criteria; phenotype B includes only HA and oligo-anovulation, without PCOM; phenotype C (HA and PCOM) and phenotype D include only oligo-anovulation and PCOM, without HA (2).

Obesity and insulin resistance are common metabolic disorders in women with PCOS (1). The associated dysfunction in lipid, protein and amino acid meta-

bolism, low-grade inflammation, and oxidative stress (3) increases the risk several times of developing type 2 diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular disease in women with PCOS (4, 5). The results from a Bulgarian study showed (6) that insulin resistance and metabolic disorders were more common among the classical PCOS phenotypes (phenotypes A and B) where hyperandrogenism was also most pronounced.

The relationship between PCOS and osteoarthritis (OA), the most common chronic joint disease, has not been extensively studied (7). The reason for suggesting and looking for an association between these two common conditions is the fact that the disturbance in the balance of sex hormones plays a key role in the pathogenesis of both PCOS and OA. Increasing studies in the field suggest a close relationship between cartilage degradation and age-related changes in sex hormones (8, 9). The role of hormonal changes in the pathogenesis of OA is confirmed by the fact that most women exhibit symptoms typical of knee osteoarthritis (KOA) in early postmenopausal age (10). The narrowing of the knee joint space in women is associated with a decrease in estrogen levels observed in menopausal age (11). These facts have led to the identification of a specific subtype of the disease, the so-called „hormone-dependent“ OA (12). The role of HA in the pathogenesis of OA, as another common hormonal disorder in women, is still poorly understood and studied.

Our study aimed to analyze the relationship between PCOS and OA by assessing early clinical manifestations of KOA using the Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) in patients with PCOS and healthy volunteers, and additionally to assess their relationship with clinical and laboratory characteristics of HA.

Materials and methods

Patients and controls

The study included 54 women diagnosed with PCOS according to the Rotterdam criteria (2). For the purpose of the study, we included only phenotypes A, B, and C, where clinical and/or biochemical hyperandrogenism was a required characteristic.

Patients with PCOS were compared with 26 healthy controls. All study participants underwent a comprehensive diagnostic assessment, including medical history, self-reported measures, clinical examination, laboratory, and hormonal tests.

Excluding criteria were: the presence of inflammatory/autoimmune rheumatic disease and/or other endocrine disorders such as thyroid disease, hyperprolactinemia, premature ovarian failure, hypothalamic amenorrhea, congenital adrenal hyperplasia, androgen-producing tumors, Cushing's syndrome or disease. Pregnant women, professional athletes, and participants who used systemic corticosteroids, antiandrogens, or insulin-sensitizing drugs (metformin, thiazolidinediones)

in the last 3 months were also excluded from the study.

The study was approved by the local ethics committee of the Medical University – Sofia (05/28.02.2020).

Anthropometric measurements and self-reported measures

Firstly, all participants signed a written informed consent. Further, detailed anthropometric measurements of all participants were performed, including height, weight, body mass index (BMI), waist (WC) and hip circumference (HC), and waist/hip ratio (WHR). BMI was calculated by the formula: weight divided by twice the height (kg/m²). The WC was measured in a horizontal plane midway between the top of the iliac crest and the lower margin of the last palpable rib in the midaxillary line, while the hip was measured at the level of the great trochanter. The WHR was calculated as WC divided by HC in cm. All anthropometric measurements were made by the same endocrinologist.

Additionally, all participants in the study filled in an internationally approved questionnaire for the assessment of the knee joint among young and physically active people - KOOS. In the two studied groups, it was used to evaluate the following domains related to the knee joint: pain, symptoms, quality of life, daily activities, and sports and recreation function. The questionnaire contained a Likert scale and all elements had five possible answer options, marked from 0 (no problems) to 4 (extreme problems) and each of the five results was calculated as the sum of the included elements. The results were transformed into a scale of 0–100, with zero corresponding to the most severe knee disorders reported by the patient and 100 to no knee problems. Results between 0 and 100 represented the percentage of the total possible result achieved. The overall result was not calculated, as it is considered desirable to analyze and interpret the five domains separately.

Laboratory tests

Fasting blood samples were taken from all participants in the follicular phase (3rd-5th day) of a spontaneous menstrual cycle or progestogen-induced menstrual bleeding by standard venipuncture. Samples were immediately carried out to measure fasting plasma glucose (FPG), serum immunoreactive insulin (IRI), total testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), androstenedione, sex hormone-binding globulin (SHBG), luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) and estradiol. The free androgen index (FAI) was calculated using the following equation: FAI = testosterone (nmol/L)/SHBG (nmol/L) × 100. Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated by the formula: HOMA-IR = FPG × IRI/22.5. All hormonal and biochemical tests were performed in the Clinical Laboratory of the University Hospital „Alexandrovska“.

Features of hyperandrogenism

HA has been confirmed in the presence of clinical features and/or elevated androgen levels (total testosterone $\geq 1,6$ nmol/L) and/or FAI ≥ 5) (13). Clinical examination for hyperandrogenism (hirsutism, acne, and/or alopecia) was performed by the same endocrinologist. Hirsutism was assessed using the modified Ferriman Gallwey [mFG] score (14) and a score of 8 or higher confirmed its presence (15). Alopecia was assessed using the Ludwig visual scale (16).

Statistics

Statistical analyses were performed using SPSS IBM Statistical Software v21.0 and GraphPad Prism v8.4. Initially, descriptive statistics were performed and the distribution of data was assessed by a Shapiro-Wilk test. The relationship between the category values was analyzed with a Chi-square test. Parametric tests (independent T-Test and Pearson correlation) were used in the case of normal data distribution, where the hypotheses were presented as a ratio of the difference between the mean values (means \pm SD). A Spearman correlation was used to estimate the correlations of skewed data. They were compared with the nonparametric Mann-Whitney U-test. Levene's Test for Equality of Variances was performed to assess the homogeneity of variance. When the data were distributed similarly, the hypotheses were presented as the ratio of medians (interquartile range [IQR]). The significance level was 0.05.

Results

Demographic, anthropometric, clinical, and hormonal characteristics of the two groups

Women with PCOS and healthy controls did not differ significantly in age and BMI. Anthropometric parameters such as height, weight, WC, HC, and WHR were also similar between the two groups. PCOS patients were significantly more hirsute compared to healthy controls ($p = 0.001$), while acne and alopecia were similarly presented between them. The PCOS group showed higher levels of total testosterone, DHEAS, androstenedione (each $p < 0.001$), FAI ($p = 0.002$) and LH/FSH ratio ($p = 0.035$). The relevant demographic, anthropometric, clinical, biochemical, and hormonal characteristics of PCOS patients and controls were presented in Table 1.

Comparisons of the KOOS domains in the two groups

Women with PCOS and healthy volunteers showed similar results when evaluating the KOOS pain, quality of life, sports and recreation function. Knee-related symptoms were significantly more prominent in the patient group than in the control group ($p = 0,035$). Knee-related daily activities were more impaired in

patients compared to controls ($p = 0,001$). Figure 1 illustrated the comparison between PCOS patients and healthy controls in all KOOS domains. Obese PCOS patients showed worse results by assessing the KOOS daily activities, compared to normal- and overweight patients ($p = 0,035$). The analysis of results from other KOOS domains indicated that no such dependence was observed.

Correlations between KOOS domains and clinical, anthropometric, hormonal, and biochemical parameters in the PCOS group

Negative weak correlations were observed between KOOS pain, symptoms, daily activities, and sport and recreation and anthropometric parameters - weight, WC, and WHR, presented in Table 2. Only KOOS quality of life did not show a significant correlation with the studied clinical, anthropometric, hormonal, and biochemical parameters. The biochemical and clinical signs of HA did not correlate with any of the KOOS domains.

Discussion

Hormonal disbalance plays a major role in the etiopathogenesis of OA (12). The decrease in estrogen levels occurring at menopausal age is associated with narrowing of the joint space (11) and a corresponding acceleration of OA. This probably determines the usual more frequent manifestation of joint symptoms in early postmenopausal age (10). The role of HA in the pathogenesis of OA in women remains poorly understood and studied. It is well known in men that androgens have a protective effect on articular cartilage (17). Whether high androgens in women have a protective effect or increase the risk of developing OA is still controversial. It has been suggested that HA may contribute to the thickening of articular cartilage observed in studies conducted in women with the syndrome (18-20). While cartilage thinning is a pathognomonic sign of OA, there is no information for the influence of its thickening. Studies show that the increasing height of hyaline cartilage may be associated with tissue deterioration in the earliest stages of OA (21, 22). The study of early pain and stiffness and the assessment of daily activity and quality of life associated with the knee joint manifestations in young women with PCOS may identify those at high risk for OA. Additionally, diagnosing OA at the earliest molecular stage of „pre-osteoarthritis“ may provide maximum benefit from future treatment (23, 24). Our cross-sectional study aimed to identify the risk of future OA in women with PCOS and to compare them with healthy volunteers by assessing the early clinical manifestations of knee OA using a validated questionnaire designed to assess knee-related disorders in young and physically active people. Additionally, the study aimed to analyze the relationship of KOOS results to the clinical and laboratory characteristics of HA.

Table 1. Demographic, anthropometric, clinical, biochemical, and hormonal characteristics of patients with PCOS and healthy controls.

Parameters	PCOS patients (n = 54)	Healthy controls (n = 26)	p value
<i>Demographic and anthropometric characteristics</i>			
Age (years)	25,9 (± 5,3)	27,9 (± 5,1)	NS
Weight (kg)	74,2 (± 20,4)	76,9 (± 19)	NS
Height (cm)	163 (± 7)	164 (± 5,3)	NS
BMI (kg/m ²)	27,5 (21; 33,1)	25,6 (22,5; 37,9)	NS
WC (cm)	83,5 (76; 101,3)	85,5 (74; 96,8)	NS
HC (cm)	100 (92; 110)	102 (94,5; 110,3)	NS
WHR	0,84 (0,78; 0,97)	0,81 (0,77; 0,91)	NS
<i>Hormonal, metabolic, and biochemical characteristics</i>			
FPG (mmol/L)	5,0 (4,7; 5,3)	5,1 (4,9; 5,3)	NS
IRI (mU/L)	9,6 (5,9; 16,8)	9,3 (6,2; 14,4)	NS
HOMA-IR	2,3 (1,3; 3,7)	2,2 (1,3; 3,3)	NS
LH (mU/mL)	7,64 (± 4,49)	6,19 (± 2,47)	NS
FSH (mU/mL)	5,2 (± 1,32)	5,54 (± 1,33)	NS
LH/FSH ratio	1,49 (± 0,81)	1,11 (± 0,36)	0,035
Estradiol (pmol/L)	130,5 (95,5;183)	147,2 (99,5;184,6)	NS
DHEAS (mcmol/L)	9,3 (6,5; 11,6)	5,5 (4,2; 7,3)	< 0,001
Androstendione (ng/mL)	4,49 (± 2,12)	2,27 (± 0,94)	< 0,001
SHBG (nmol/L)	42 (28,6; 74,3)	54 (28,3; 79)	NS
<i>Biochemical features of hyperandrogenism</i>			
Total testosterone (nmol/L)	1,65 (± 0,73)	0,91 (± 0,34)	< 0,001
FAI	3,37 (1,8; 6,8)	1,51 (1,1; 3,1)	0,002
<i>Clinical features of hyperandrogenism</i>			
mFG score	8 (4; 14)	3 (0,8; 6,3)	0,001
Acne	13/54	4/26	NS
Alopecia	1/54	0/26	NS

BMI – body mass index;
DHEAS – dehydroepiandrosterone sulfate;
FAI – free androgen index;
FPG – fasting plasma glucose;
FSH – follicle stimulating hormone;
HC – hip circumference;
HOMA-IR – homeostatic model assessment of insulin resistance;
IRI – immunoreactive insulin;
LH – luteinizing hormone;
mFG score – modified Ferriman Gallwey score;
NS – non-significance;
PCOS – polycystic ovary syndrome;
SHBG – sex hormone-binding globulin;
WHR – waist-to-hip ratio;
WC – waist circumference.
 Normally distributed data are presented by mean (± SD). Skewed distributed data are presented as median (IQR). Categorical values are presented as a proportion of the total number (n/N).

Patients with PCOS in our study were significantly more hirsute than controls, and the levels of all androgens were significantly higher among them. Analyzing the results of the five KOOS domains showed that women with PCOS were more likely to experience knee-related symptoms and disturbances in daily activities than healthy controls. This could not be fully explained by obesity and the associated knee weight load, because PCOS patients and controls had similar demographic and anthropometric characteristics, including BMI.

A recent large-scale study revealed a higher prevalence and accelerated incidence of OA in both obese and non-obese PCOS (25). Our data confirmed that obesity played a role in the manifestation of joint disorders, especially in knee-related impairment of daily ac-

tivities rather than the manifestation of knee symptoms. Probably, the abdominal type of obesity, expressed in increased WC and WHR, may affect the appearance of knee symptoms, pain, knee-related disorders in daily activities, and sports and recreation function. Interestingly, clinical and biochemical signs of HA did not affect the results of the KOOS questionnaire. In addition, domains KOOS pain, KOOS quality of life, and KOOS sports and recreation function did not show a significant difference between patients and controls. Nevertheless, we could conclude that the diagnosis of PCOS was more often associated with joint complaints and knee-related disorders in daily activities. Moreover, weight gain and increased WC had an additional negative impact in contrast to HA. The data analysis had taken

Table 2. Correlations between the KOOS domains and anthropometric parameters.

Parameters	KOOS pain	KOOS symptoms	KOOS daily activities	KOOS sport and recreation function	KOOS quality of life
Weight (kg)	NS	NS	r = -0,304 p = 0,025	r = -0,289 p = 0,034	NS
WC (cm)	NS	NS	r = -0,344 p = 0,011	r = -0,328 p = 0,016	NS
WHR	r = -0,290 p = 0,033	r = -0,296 p = 0,030	r = -0,321 p = 0,018	r = -0,334 p = 0,014	NS

WHR – waist-to-hip ratio;

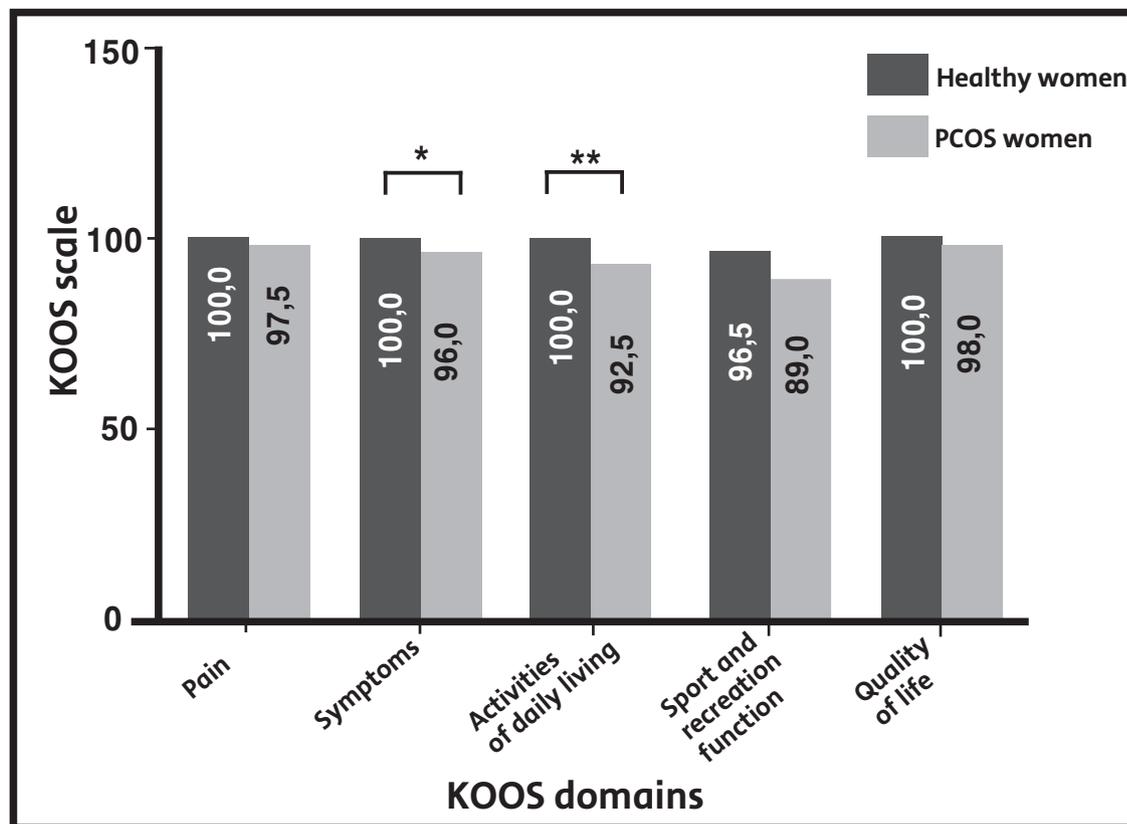
KOOS – Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score;

NS – non-significance.

Pearson correlation was used in the case of normal data distribution. Spearman correlation was used to estimate skewed data.

Figure 1.

Comparison of individual KOOS domains between PCOS patients and healthy controls.



PCOS – polycystic ovary syndrome;

KOOS – Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score

* p = 0,035; ** p = 0,001

into account the fact that low self-esteem and psychological characteristics among women with PCOS (26) might partly explain the results of the KOOS questionnaire. Large-scale prospective studies are needed to confirm our hypothesis and to analyze the causal relationship between PCOS and knee disorders.

The limitations were the small number of studied women and the cross-sectional design of the study which was rather explanatory and aimed to lay the groundwork for large-scale prospective studies that will allow us to assess the causal relationship of HA and KOA.

Conclusion

Knee-related symptoms and disturbances in daily activities were more common in women with PCOS than their age- and BMI-matched healthy controls. Abdominal obesity might further contribute to knee-related dysfunction in daily activities, while HA showed no association with knee complaints in our study.

References

1. **Azziz R.** Polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 2018; 132 (2): 321-336.
2. **ESHRE/ASRM.** Rotterdam Sponsored PCOS Consensus Workshop Group Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81:19-25.
3. **Spritzer PM, Lecke SB, Satler F, Morsch DM.** Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reproduction* 2015; 149 (5): R219-27
4. **Orbetzova M, Kamenov Z, Kolarov G, Orbetzova V, Genchev G, Genov N, et al.** Metabolic disturbances in women with polycystic ovary syndrome. *Folia Med* 2003; 45 (3): 12-20.
5. **Gateva A, Kamenov Z.** Cardiovascular risk factors in Bulgarian patients with polycystic ovary syndrome and/or obesity. *Obstet Gynecol Int* 2012; 2012: 1-11.
6. **Pehlivanov B, Orbetzova M.** Characteristics of different phenotypes of polycystic ovary syndrome in a Bulgarian population. *Gynecol Endocrinol* 2007; 23 (10): 604-609.
7. **Bijlsma JWJ, Berenbaum F, Lafeber FJG.** Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 2011; 377: 2115-2126.
8. **Sowers MR, McConnell D, Jannausch M, Buyuktur AG, Hochberg M, Jamadar DA.** Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2481-2487.
9. **Szoeke CEI, Cicuttini FM, Guthrie JR, Clark MS, Dennerstein L.** Factors affecting the prevalence of osteoarthritis in healthy middle-aged women: data from the longitudinal Melbourne Women's Midlife Health Project. *Bone* 2006; 39: 1149-1155.
10. **Nadkar MY, Samant RS, Vaidya SS, Borges NE.** Relationship between osteoarthritis of knee and menopause. *J Assoc Physicians India* 1999; 47: 1161-1163.
11. **Bergink AP, van Meurs JB, Loughlin J, Arp PP, Fang Y, Hofman A, et al.** Estrogen receptor alpha gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1913-1922.
12. **Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Castañeda S, Jimenez SA.** Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical, and therapeutic characteristics. *Semin Arthritis Rheum* 2009; 39: 71-80.
13. **Ibáñez L, Ong KK, López-Bermejo A, Dunger DB, de Zegher F.** Hyperinsulinaemic androgen excess in adolescent girls. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10: 499-508.
14. **Ferriman D, Gallwey JD.** Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1961; 21: 1440-1447.
15. **Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D.** Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 140: 815-830.
16. **Lizneva D, Gavriloja-Jordan L, Walker W, Azziz R.** Androgen excess: Investigations and management. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2016; 37: 98-118.
17. **Da Silva JA, Larbre JP, Spector TD, Perry LA, Scott DL, Willoughby DA.** Protective effect of androgens against inflammation induced cartilage degradation in male rodents. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 285-291.
18. **Eryılmaz ÖG, Kara M, Tiftik T, Aksakal FN, Uzunlar Ö, Su FA, et al.** Ultrasonographic measurement of the femoral cartilage thickness in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2012; 97: 235-237.
19. **Kara M, Okur A, Serin Hİ.** Ultrasonographic evaluation of femoral cartilage thickness in patients with polycystic ovary syndrome. *Acta Clin Croat* 2019; 58: 103-106.
20. **Kabakchieva P, Georgiev T, Gateva A, Hristova J, Kamenov Z.** Polycystic ovary syndrome and (pre)osteoarthritis: assessing the link between hyperandrogenism in young women and cartilage oligomeric matrix protein as a marker of cartilage breakdown. *Clin Rheumatol* 2021. DOI: 10.1007/s10067-021-05753-0.
21. **Calvo E, Palacios I, Delgado E, Sanchez-Pernaute O, Largo R, Egido J, et al.** Histopathological correlation of cartilage swelling detected by magnetic resonance imaging in early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12(11): 878-86.
22. **Sakthiswary R, Rajalingam S, Hussein H, Sridharan R, Asrul AW.** Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and its correlation with sonographic knee cartilage thickness and disease activity. *Clin Rheumatol* 2017; 36: 2683-2688.
23. **Georgiev T.** Multimodal approach to intraarticular drug delivery in knee osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2020; 40: 1763-1769.
24. **Georgiev T, Angelov AK.** Modifiable risk factors in knee osteoarthritis: treatment implications. *Rheumatol Int* 2019; 39(7): 1145-1157.
25. **Kluzek S, Rubin KH, Sanchez-Santos M, O'Hanlon MS, Andersen M, Glintborg D, et al.** Accelerated osteoarthritis in women with polycystic ovary syndrome: a prospective nationwide registry-based cohort study. *Arthritis Res Ther* 2021. DOI:10.21203/rs.3.rs-156809/v1.
26. **Barnard L, Ferriday D, Guenther N, Strauss B, Balen AH, Dye L.** Quality of life and psychological well being in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2007; 22: 2279-2286.



Българско Дружество по Ендокринология (БДЕ)

СЪОБЩЕНИЕ

Напомняме на нашите колеги-членове на БДЕ:

1 Да преведат по банковата сметка на БДЕ годишния си членски внос за 2020 г. – 50 лева и за 2021 г. – 50 лева или общо 100 лв.

(в членския внос е включен и годишният абонамент за сп. Ендокринология за 2020 и 2021 година)

Банкова сметка на която да се направи преводът е:

Булбанк, IBAN – BG06UNCR76301076254999

за БДЕ членски внос за 2020 и 2021 г. от (име, фамилия)

Размер на Членския внос за Сдружението, съгласно Решение на Общото събрание на БДЕ от 2007 г:

✓ 50,00 лв. за специалист (30,00 лв. се превеждат на сп. Ендокринология и 20,00 лв. остават в БДЕ)

✓ 25,00 лв. за специализант/докторант (15,00 лв. се превеждат на сп. Ендокринология и 10,00 лв. остават в БДЕ).

2 Колегите, които са променили адресната си регистрация, да изпратят най-подробна информация с актуален адрес за получаване на сп. Ендокринология, вкл. пощенски код на селището, жк ..., блок ..., етаж ..., апартамент ..., име ...
на e-mail: anmarbor@abv.bg - проф. Борисова

3 Специализантите, които успешно са положили държавния изпит по ендокринология, да сканират и изпратят сканираната си диплома, за да бъдат пререгистрирани като ендокринологи в базата-данни на БДЕ.

С това съществено се променя статутът им.

4 Има нови специализанти по ендокринология, които не са членове на БДЕ, но желаят да получават сп. Ендокринология.

Редът за оформяне на членство е следният:

а) Влиза се в Интернет страницата на БДЕ – www.endo-bg.com, с бутон Регистрация се изважда Регистрационна карта, която се попълва най-подробно в Word формат, съхранява се и се изпраща. Така най-лесно информацията се въвежда в базата-данни на БДЕ.

б) Вторият документ е писмо-уверение от началника на Клиниката/Отделението, където специализират, или от Управителя на лечебното заведение. Така се удостоверява административно началото на специализацията по ендокринология.

в) След потвърдена редовна регистрация

се прави банков превод на членски внос от 25,00 лв. за съответната календарна година по посочената банкова сметка.

Българско Дружество по Ендокринология (БДЕ)

Българско дружество по ендокринология *Bulgarian Society of Endocrinology*

Списание
ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ISSN 1310-8131

Journal
ENDOCRINOLOGIA ISSN 1310-8131

Адрес на редакционната колегия:

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

Editorial Board address for correspondence:

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

Списание „Ендокринология“, издание на Българското дружество по ендокринология, излиза в 4 книжки годишно. В него се отпечатват оригинални научни статии, описания на клинични случаи, обзори, рецензии, информация за проведени и предстоящи научни събития и други материали в сферата на клиничната ендокринология. Обзорните материали от български автори излизат на български език с резюме на български и английски език. Оригиналните статии и казуси се отпечатват едновременно на български и английски език. По усмотрение на авторските колективи и преценка на редакционната колегия въз основа характера на материала, някои оригинални статии могат да бъдат публикувани само на български език. Материалите, предоставени от чужди автори, се 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 формати .xls (MS Excel), .ppt (MS PowerPoint), .eps (encapsulated postscript), които позволяват редактиране. Снимки (собствени), както и репродукциите на ползвани от чужди източници от Интернет да бъдат представяни с добро качество във формат JPEG и резолюция 300 dpi. Текстът към илюстрациите се представя в края на основния текст, след таблиците. Номерацията на таблиците и илюстрациите е с арабски цифри и се посочва в основния текст. При използване на чужд илюстративен материал, последният трябва да бъде придружен със съответно съгласие за възпроизвеждане от носителя на авторските права. Това се указва в текста към илюстрацията.

Книгопис

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

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

References

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

Examples

Reference to a journal article:

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

If the original cited paper is in Bulgarian:

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

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

Примери:

Статия от списание:

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

2. **Christov 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.

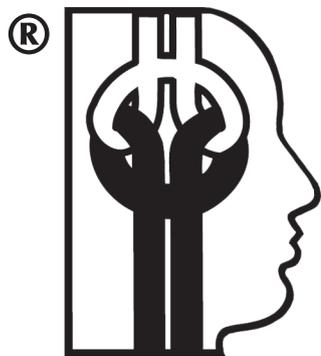
Address for sending the manuscripts and other editorial correspondence

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

Адрес на редакционната колегия:

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

Editorial Board address for correspondence:

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

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

- SCOPUS Elsevier
Bibliographic Databases
(2001-2017)
- EMBASE
- Bulgarian Citation Index
(since 1996)
- EBSCO
(since 2019)