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

Ендокринология
Endocrinologia

- Мелатонин и женски фертилитет: новости и ползи при използването му като терапевтичен агент
  Melatonin and Female Fertility: Recent Advancements and its Use as a Therapeutic Agent
- Нарушения в тиреоидната ос и хормони при хронична обструктивна белодробна болест
  Changes in the Thyroid Axis and Hormones in Chronic Obstructive Pulmonary Disease
- Оценка на нивата на прооксидативни и антиоксидантни маркери в експериментални животински модели с различни диетични режими
  Assessment of the Levels of Pro-oxidative and Anti-oxidative Markers in Experimental Animal Models with Different Dietetic Regimens
- Полови хормони при мъже със захарен диабет тип 1
  Sex Hormones in Men with Type 1 Diabetes Mellitus
- Болест на Von Hippel-Lindau: Какъв клиничен фенотип определя хотспот мутацията с. 500G>A (p.Arg167Gln)?
  Von Hippel-Lindau Disease: What Clinical Phenotype Does the Hotspot Mutation c. 500G>A (p.Arg167Gln) Determine?

Българско дружество по ендокринология
Bulgarian Society of Endocrinology

2/2022

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

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ
ENDOCRINOLOGIA

Българско дружество по ендокринология

Списанието се индексира от/The journal is indexed by:
- ***Elsevier Bibliographic Databases, (SCOPUS) Netherlands***
- ***EMBASE*** · ***EBSCO***
- ***Bulgarian Citation Index***

Том XXVII / Volume XXVII

Bulgarian Society of Endocrinology 2/2022

ISSN 1310-8131(Print) ISSN 2683-0787(Online)
списание Ендокринология том XXVII, книжка 2/2022

Съдържание

Journal Endocrinologia volume XXVII, number 2/2022

Contents

Българско дружество по ендокринология

Bulgarian Society of Endocrinology

Мелатонин и женски фертилитет: новости и ползи при използването му като терапевтичен агент

Маурицио Нордио
Катедра по Експериментална медицина, Университет „Сапиенца“, Рим, Италия

Постъпване: 24. 03. 2022 г./ *Приемане:* 01. 04. 2022 г.

Melatonin and Female Fertility: Recent Advancements and its Use as a Therapeutic Agent

Maurizio Nordio
Department of Experimental Medicine, University „Sapienza“, Rome, Italy

Submitted: 24. 03. 2022/*Accepted:* 01. 04. 2022

Резюме

Мелатонинът е добре познат хормон, играещ особена роля в синхронизирането на ендогенния ни часовник с външната среда – процес, чрез който се постига подобряване на адаптивните способности и всеобщите функции, както и удължаване на продължителността на живот при живите организми. В допълнение, преди повече от две десетилетия се появяват доказателства за това, че мелатонинът действа като мощна антиоксидантна молекула, представляваща важна част от специфичните защитни антиоксидантни механизми на тялото. Всъщност, той демонстрира както пряк, така и косвен ефект, насочен срещу процеса на окисление. Що се отнася до първия – известно е, че мелатонинът представлява най-мощният ендогенен „очистител“ на свободни радикали, описан до този момент. Във втория случай – той оказва стимулиращо влияние върху други антиоксидантни молекули (напр. глутатион), като по индиректен начин води до подобряване ефективността на цялата антиоксидантна система.

Знае се, че репродуктивната функция, по-специално тази на женската полова система, показва силно изразена чувствителност към хронични увреди и оксидативно-стресови фактори.

Abstract

Melatonin is a well-known hormone that has a particular ability in synchronizing our endogenous clock with the external environment, therefore increasing the adaptability, functions and life span of living organisms. In addition, more than two decades ago, it was discovered that melatonin acts as a potent antioxidant molecule, therefore being an important part of the antioxidant mechanism of the body. In fact, it demonstrates both a direct and an indirect effect against oxidation. As far as the first one is considered, melatonin is the most potent free radicals endogenous scavenger known to date. In the second case, it has a stimulatory effect on other antioxidant molecules such as glutathione, therefore indirectly ameliorating the efficiency of the entire antioxidant mechanism.

The other side of the coin is the reproductive system, in particular the female reproductive system, which is considered to be very sensitive to chronodisruption and to oxidative insults. In particular, melatonin is able not only to re-synchronize altered hormonal rhythms and to protect the oocytes from oxidation, but it is also endogenously produced by the follicle itself that contains the appropriate machinery, thus indicating the importance of melatonin.

Важното значение на мелатонина се състои не само в неговата способност да ресинхронизира отклоненията хормонални ритми и така да предпазва ооцитите от окисление, но и във възможността за собственото му ендогенно производство от специфична система, намираща се в самия фоликул.

Имайки предвид казаното до момента, целта на настоящия обзор е да се фокусира, от една страна, върху ролята на мелатонина като част от синхронизиращата система, включително върху някои причини и последици от нарушенията в циркадианните ритми, а от друга – да покаже способността му да протектира твърде уязвимите тъкани, каквато е женската полова система, от влиянието на оксидативния стрес. Накрая е поставен акцент върху употребата на мелатонин при лечението на нарушения в циркадианните ритми – тогава, когато е необходим по-мощен антиоксидантен подход.

Ключови думи:

мелатонин; женска репродуктивна система; циркадианни ритми; антиоксиданти

With that in mind, this review focuses, on one side, on the role of melatonin as a part of the synchronizing system, including also some causes and consequences of chronodisruption. On the other side on its ability to protect sensitive tissues, as the female reproductive one, from oxidative events. Finally, emphasis is given to melatonin use in the therapy of circadian rhythms dysregulations and when a more potent antioxidant approach is necessary.

Key words:

melatonin; female reproductive system; circadian rhythms; chronodisruption

Въведение

Въведение – произход и основни биологични характеристики на мелатонина

Историята за същността на мелатонина датира от началото на човешката еволюция. В действителност тази малка молекула, известна още като биогенен амин или индол (моларната му маса е 232.278 g/Mol), се появява много рано в живите организми. Впоследствие тя започва да се "изолира„ по време на цялата еволюция, като мелатонинът, присъстващ в сегашните живи организми, се счита за идентичен с този в цианобактериите, които съществуват на Земята от милиарди години. Открива се официално през 1958 г. от Лернер (1). Оттогава досега интересът към тази молекула не затихва, напротив - поражда появата на множество научни разработки, опитващи се да разгадаят мистерията около нейното значение (1).

Изначално се смята, че производството на мелатонин е само от епифизната жлеза, но с течение на времето се натрупват все повече доказателства, че той се секретира от много, ако не и от всички клетки на човешкия организъм. Първоначално действието на мелатонина се свързва с регулацията на циркадианния (и годишния) ритъм, като напоследък се появяват проучвания, потвърждаващи функционалното разнообразие на този биогенен амин ефекти на молекулярно ниво, които са в състояние да модифицират физиологията на органите и организмите като цяло (2). Идеята, че мелатонинът може да се произвежда само у животни, притежаващи епифизна жлеза, с времето претърпява модификация, тъй като се доказва, че всеки жив организъм, включително бактерии, едноклетъчни организми и растения, има способността да го синтезира. Що се отнася до трансдукцията на мелатониновия сигнал, индолът действа чрез добре познати мембранни рецептори (MT1 и MT2) (3), а също и с помощта на ядрени такива (RZR/ROR алфа) (4) . Въпреки това, неговите действия далеч не се обясняват със свързването му само с този вид рецептори. Свързващи за него зони са описани както в цитозола, така и на ниво митохондрии. В допълнение, установени са и някои рецептор-независими ефекти на мелатонина и доказателство за това е способността

му да действа като „очистител“ на радикали, преминавайки различни физиологични бариери в организма. Смисълът на всичко представено до момента е, че вероятно няма клетка или функция от растителния и животинския свят, която да остане „недокосната“ от въздействието на мелатонина. Всъщност, той изпълнява есенциална роля при редица физиологични процеси, а също така има огромно значение и при етиопатогенезата на множество нарушения (5).

Наскоро се докладва, че първоначалното действие на мелатонина във фотосинтетичните цианобактерии, появявили се на Земята преди 3,2-3,5 милиарда години, е това на антиоксидант. Това се обяснява с факта, че фотосинтезата е процес, свързан с генерирането на токсични свободни радикали. Другите функции на мелатонина се развиват в много по-късен етап на еволюцията (6). Знае се, че кислородът е основен елемент за аеробните организми, тъй като оксидативният метаболизъм представлява базисен енергиен източник за всички живи организми. Въпреки това, частичната редукция на O_2 при нормалната физиология на организмите, води до образуване на реактивни кислородни видове (ROS). Тези молекули включват две основни групи:

1. *свободни радикали,* например – *супероксиден анион и хидроксилен радикал* и

2. *молекули, като водороден пероксид*.

Известно е, че оксидативният стрес възниква при дисбаланс между про-оксидантни и анти-оксидантни молекули във връзка с увеличаване на ROS и на реактивните азотни видове (RNS), както и намаляване на активността на защитния антиоксидантен механизъм. Мелатонинът изпълнява основна роля в споменатия протективен противоокислителен механизъм. Всъщност, тази многофункционална биогенна молекула, чиято амфифилна природа й дава възможност да преминава през различни морфо-физиологични бариери и всички субклетъчни отдели, предпазва клетъчните мембрани, електрон-транспортните вериги и митохондриите от оксидативна увреда (7). В полза на последните данни е намерената значително повишена концентрация на мелатонин (индол) на ниво субклетъчно пространство в сравнение с тази в кръвта. Вероятно мелатонинът навлиза в митохондриите чрез олигопептидни транспортери (PEPT1 и PEPT2) и изглежда, че функционира като апикален антиоксидант (4). Освен че постъпва от циркулацията, мелатонинът може да се произвежда и от самите митохондрии, като последните научни данни потвърждават ролята му в допълнителната защита като мощен антиоксидант (8, 9). Освен това, мелатонинът увеличава пропускливостта на мембраните и действа като инхибитор на липооксигеназата, спомагайки за поддържането на ефективността на локалната антиоксидантна система (10).

Следователно – високите концентрации на мелатонина, действащ като антиоксидант, осигуряват мощна антиоксидантна защита на всички тези органели, които обикновено са изложени на вредното въздействие на свободните радикали. Важно е да се отбележи, че молекулата на мелатонина, за да изяви собствената си антиоксидантна активност, трябва да премине през процес на окисление и не може да бъде редуцирана в изходното си положение, тъй като образува няколко стабилни продукта, свързвайки се със свободните радикали. Поради тази причина мелатонинът става известен като „краен“ или „суициден“ антиоксидант и концентрацията му във физиологичните течности намалява с напредване на процеса на „очистване“. В допълнение, неговите метаболити също притежават антиоксидантни свойства; по този начин защитата, която се осигурява срещу оксидативното увреждане на клетките (особено на ДНК) се превръща в непрекъснат процес (11).

Секреция и метаболитен път на мелатонина. Мелатонинов циркадианен ритъм – норма и патология.

Поддържането на добро здраве зависи от прецизно организираната вътрешна система, която се синхронизира с дневния/нощен (светлина/тъмнина) цикъл на външната среда. Тази стриктна организация се осигурява от сложен механизъм, включващ „биологичен часовник“ (разположен в супрахиазмалното ядро, SCN), който е в състояние да демонстрира автономен циркадианен ритъм от малко повече от 24 часа. На клетъчно ниво макромолекулният транскрипционно-зависим осцилатор се формира от т. нар. „часовник“, по-точно – от гените, контролирани от него, които допринасят за ритмичните функции на организма. Знае се, че клетките имат определен циркаден ритъм, подпомагащ способността им да оцеляват, като от съществено значение е този ритъм да бъде добре синхронизиран с външния дневен/нощен цикъл, за да се балансират ендогенните процеси. Тази роля се изпълнява от мелатонина (N-ацетил-5-метокситриптамин), добре познатият, произхождащ от триптофана, индол на епифизната жлеза. Той се произвежда и секретира според циркадианния ритъм, свързан с цикъла светлина/тъмнина.

Доказано е, че най-малко четири ензима

участват в синтеза на мелатонина. Един от тях е арил-алкил-аминовата-N-ацетил-трансфераза (NAT), която се счита за скорост-регулиращ ензим на мелатониновата биосинтеза. NAT се характеризира с целодневен ритъм на секреция, достигайки 100 пъти по-високи концентрации по време на тъмната фаза, в сравнение с светлата част на деня. Симпатикусовите нервни окончания в горния цервикален ганглион освобождават норепинефрин (NE) в съответствие с циркадианния ритъм, който се свързва с цикъла светлина/тъмнина в околната среда, увеличавайки секрецията на NAT по време на тъмната фаза. NE индуцира мелатониновата биосинтеза от епифизните клетки, стимулирайки превръщането на триптофана в 5-хидрокситриптофан (чрез ензима триптофанхидроксилаза), който впоследствие се декарбоксилира до серотонин. Серотонинът се ацетилира в N-ацетил-серотонин (от NAT), който накрая претърпява О-метилиране до образуване на мелатонин с помощта на хидрокси-индол-О-метил-трансферазата (HIOMT). Веднъж попаднало в кръвообращението, приблизително 70% от количеството на синтезирания мелатонин се свързва с албумин, а останалите 30% се поемат от околните тъкани.

Основният метаболитен път на мелатонина преминава през черния дроб, където молекулата се хидроксилира до 6-хидроксимелатонин, след това се конюгира със сулфат или глюкуронат и накрая се екскретира с урината. Установено е, че дневната експозиция на ретината на светлина влияе пряко върху производството на мелатонин, потискайки ритъма му. Това се дължи на директната невронна връзка между окото и епифизната жлеза, чрез която се получава ясна информация за наличието на светлина или тъмнина в околната среда. Счита се, че мелатонинът е повсеместна молекула – „пътува" из целия човешки организъм, достига различни тъкани и органи. Химическото му изолиране във всички изследвани до момента видове го прави кандидат за универсална сигнална молекула. Нивата на мелатонина се смятат за най-точния периферен маркер на човешкия циркадианен ритъм на базата на програмирания вътрешен 24-часов часовник (12).

Не съществуват отдели в човешкия организъм, съхраняващи мелатонина, затова измерените му нива в плазмата директно отразяват количеството на синтезирания от епифизата индол. При хората секрецията на мелатонин се увеличава непосредствено след настъпване на нощта, с наблюдаващ се пик след полунощ (между 2:00 и 4:00 часа) и последваща фаза на постепенно намаляване на концентрациите му в кръвта във втората половина на тъмната част. Серумните нива на мелатонина през нощта могат да варират значително според възрастта на индивидите, като най-високо количество се отчита през първите години от живота, спадайки непосредствено преди пубертета, достигайки стабилни стойности през цялата зряла възраст и накрая – намалявайки прогресивно по време на процеса на стареене (13).

Съгласно циркадианния си ритъм, мелатонинът се отделя най-вече през нощта, с най-ниски плазмени нива през деня. Следователно, светлината се счита за най-ефективният намаляващ секрецията на мелатонина фактор. Експериментално, хроничното излагане на светлина по време на нощта (особено при къса дължина на светлинната вълна на спектъра 460-480 nm, т.нар. синя светлина) води до сериозни нарушения, засягащи благополучието и нормалните функции в човешкия организъм. За разлика от нашите предци, които са живели единствено и само в естествени среди, представителите на съвременното човешко поколение от развитите страни имат възможността целенасочено да контролират цикъла светлина/тъмнина. Неминуемо модернистичният начин на живот води до промени, касаещи излагането на светлина – прогресивно общо намаляване на интензивността и времето на действие на светлината; забавяне и редуциране на експозицията през деня и повишаването ѝ през нощта; и накрая – изместване на светлинния спектър към използване на изкуствени източници на светлина в насока син компонент. Доказано е, че светлината през нощта с дължина на вълната между 460-480 nm може да причини увреждане на окото – проникването ѝ в клетките и техните органели може да предизвика генериране на ROS в митохондриите на ретиналния епител и дори развитие на апоптоза.

В заключение, нощното осветление, по-конкретно това от късо-вълновия спектър (напр. екрани на мобилни телефони и таблети), трябва да се избягва, защото синята светлина през нощта има по-силно въздействие върху клетките на ретината в сравнение с това на слънчевата синя светлина през деня (14). Затова, напоследък се разработват приложения, целящи намаляване на отрицателните ефекти от използването на електронни устройства през нощта чрез регулиране на цветовата температура на дисплея според естествения цикъл светлина/тъмнина, а именно – редукция на влиянието на синя светлина през нощта и увеличаването му през светлите часове на деня. Въпреки това, за да се поддържа благополучието на циркадианния ритъм, е необходимо използването на подходящи нива на осветление през деня. Дневната

светлина не трябва да бъде бедна на вълни с къса дължина, тъй като максималната човешка циркадианна чувствителност по отношение на способността за потискане на мелатонина се среща в тази част на спектъра.

Съществуват няколко ситуации, при които индивидите биват изложени на хронично увреждащо циркадианните ритми осветяване със сериозни негативни ефекти върху човешкото здраве (15). Такава, например, е работата на смени, която се среща изключително често в нашето съвремие. Има доказателства, че приблизително 15 до 20% от работещите индивиди в Европа и САЩ изпълняват задълженията си по време на смени, включително и през нощта. Броят им се повишава до 30%, когато се разглеждат секторите на производството, минното дело, транспорта, здравеопазването, комуникациите и хотелиерството. Редица епидемиологични изследвания демонстрират повишен риск от развитие на определени видове злокачествени заболявания, а именно – рак на гърдата и ендометриума, простатата, дебелото черво и ректума. Причината е нарушаването на действието на циркадианния осцилатор в резултат на променения мелатонинов циркадианен ритъм с редуциране на мелатониновите концентрации поради използваната през нощта светлина. В този ред на мисли съществуват данни, препоръчващи на жените с наследствена предразположеност към рак на гърдата да избягват използването на светлина през нощните часове (16).

Тъй като циркадианният осцилатор участва в регулирането на сигналния път на клетъчно делене, неговото евентуално увреждане би довело до нарушения в контрола на клетъчния цикъл с последица – ускоряване на растежа на злокачествени клетки. Освен това, съпътстващото намаляване на концентрациите на мелатонина може да предизвика „изчерпване“ на наличността му като антиоксидантна молекула, съответно – стимулиране на туморогенезата и ускоряване на злокачествения растеж. Това предположение е в съответствие с факта за наблюдавания процес на стимулиране на липидна пероксидация и намаляване на глутатион пероксидазата и супероксид дисмутазата при животински модели с експериментално отстранени епифизни жлези. В допълнение се демонстрира и взаимовръзка между работата на смени и наличието на метаболитен синдром, сърдечно-съдови заболявания и захарен диабет тип 2 (ЗДт2) (14). Показано е, че нарушенията в храненето и наличието на затлъстяване, както и артериална хипертония, могат да бъдат следствие или да се влошат от работата на смени, която допълнително води и до отклонения в съня. Безсънието също се свързва с промени в поведението на хранене и регулацията на телесното тегло.

Корелацията между повишения индекс на телесна маса вследствие нощно хранене и влиянието на циркадианната ритмичност при усвояването на хранителните вещества е сложна и изисква допълнителни научни обследвания. Наскоро се доказа, че инсулиновата резистентност се влошава от смущения в циркадианния ритъм при условия на хронично безсъние (17). Освен това, промяната в инсулиновата чувствителност се характеризира и с увеличение на маркерите за възпаление при изследваните индивиди. Една от предвидимите последици на провокирания нощен мелатонинов дефицит под влиянието на изкуствена светлина, е индуцирането на повишено окислителното увреждане на биомолекулите. Доказано е, че циркадианните смущения, наблюдавани при повтарящи се смени на денонощните фази, увеличават оксидативната увреда, намаляват продължителността на живот при животни и водят до увеличаване количеството на 8-хидроксидеоксигуанозин (продукт, произтичащ от свободно радикално увреждане на ДНК) в ДНК при работещите на смени (18).

Друга честа ситуация, при която се нарушава вътрешният циркадианен ритъм, е т. нар. „джет-лаг“ (часова разлика) – бързо пътуване през различни часови зони с настъпваща твърде драстична промяна в организма, непозволяваща гладко адаптиране на ендогенната циркадианна система. Всъщност, мелатониновият ритъм се измества, като не съвпада с цикъла светлина/мрак на външната среда. Чести симптоми са нарушения в съня, поява на тревожност, потиснато настроение, стомашно-чревни оплаквания и световъртеж. През последните години се наблюдава т. нар. социален „джет-лаг“ – изместване на времето за сън и активност с няколко часа през работните и съответно почивните дни, особено при по-младите индивиди. Освен това, както бе отбелязано по-горе, ползването на интернет, видео игри и телевизия до късно през нощта предизвиква намаляване на физиологичното нощно покачване на мелатонина поради излагането пред съвременни LED екрани, за които е известно, че потискат мелатониновата секреция поради по-високото си съдържание на синя светлина в сравнение с това на белите крушки с нажежаема жичка и компактните луминесцентни крушки. В резултат на това при юношите се развива дисбаланс между биологичните и социалните ритми, който заедно със загубата на сън, водят до умора, дневна сънливост, поведенчески проблеми и недобри академични постижения.

Всичко това е предпоставка за бъдещи здравословни проблеми като развитие на затлъстяване, метаболитен синдром, ЗДт2, повишен сърдечно-съдов риск и инфертилитет (19).

Проведените епидемиологични проучвания показват, че децата в днешно време спят приблизително 1,2 часа по-малко от връстниците си от миналия век. Късното лягане и заспиване и по-ранното събуждане при съвременните юноши водят до десинхронизация в денонощния ритъм. Много важни са резултатите от няколко проучвания сред подрастващите, а именно наблюденията, че 47,8% от гимназистите в Индия, 25% в Япония, 22,8% в САЩ, 16,1% в Китай и 9,9% в Испания страдат от безсъние поради много и различни причини, като основни фактори за това са нарушените навици и неправилният начин на живот (20). В този аспект е разработена технология, осигуряваща часове на отдих при тези индивиди и целяща корекция на недостига на сън (21). Следователно, хроничният социален „джетлаг“, наблюдаван при немалък брой от подрастващите индивиди, трябва да се разглежда като есенциален проблем в сферата на общественото здраве. Напоследък се публикуват все повече данни, показващи, че популацията от деца в предучилищна възраст е особено чувствителна към вечерно излагане на светлина по отношение на потискане на мелатониновото освобождение с крайна последица – лесно и бързо нарушаване на циркадианния ритъм (22). Ето защо, съвсем скоро бе разработен специален бял светлинно-излъчващ диод (освободен от излъчването на синя светлина), имащ за цел редуциране на описаните хронобиологични нарушения (23).

Мелатонин и репродукция

Добре известно е, че неадекватното време за поява, спектър и интензитет на входящата светлина към ретината в резултат на нощни активности и сън през деня, е ключов фактор за обясняване на честотата на нарушаване на хронобиологичните ритми, тъй като не само предизвиква нестабилност на главния вътрешен пейсмейкър, но също така намалява синтеза на мелатонин. Както беше отбелязано, намаленият синтез на мелатонин поради многократните епизоди на излагане на светлина по време на нощта играе важна роля в патогенезата на редица заболявания: рак на гърдата, сърдечно-съдови проблеми, ЗДт2, когнитивна дисфункция, репродуктивни нарушения при мъже и жени (24). Що се касае до последните – установена е строга взаимовръзка между нивата на мелатонина и женската оплодителна способност. От десетилетиянасам се знае, че мелатонинът участва в регулацията на репродуктивната система и при двата пола, като последните научни данни категорично затвърждават знанията ни в тази област (25).

Всъщност, мелатонинът е в състояние да контролира репродуктивната ос с помощта на изключително сложен механизъм, включващ регулирането на секрецията на гонадотропин-освобождаващия хормон (GnRH) и активността на инхибитора на гонадотропин-освобождаващия хормон (GnIH). Счита се, че GnIH играе съществена роля в сигналния път, регулиращ мъжката и женската репродуктивна система, действайки директно върху GnIH-невроните чрез рецепторите си, за да стимулира (при птици) или потиска (при бозайници) експресията и освобождаването на GnIH (26). Така, при бозайниците GnIH е в състояние да инхибира активността на компонентите от хипоталамо-хипофизо-гонадната ос, променяйки и сексуалното поведение. Съдържанието на GnIH в мозъка се влияе от промени в продължителността на деня. Съществуват доказателства, че мелатонинът стимулира освобождаването на GnIH от хипоталамуса както на птици, така и на бозайници. Изключително забележителен е фактът, че GnIH-невроните имат способността да експресират мелатонинови рецептори на повърхността си, като по този начин се предполага наличието на строга регулаторна взаимовръзка между епифизарния хормон и действието на GnIH в мозъка (27). В допълнение, установено е, че мелатонинът стимулира секрецията на прогестерон от гранулоза клетки (28).

Описан е и друг прицелен за действието на мелатонина орган – хипофизната жлеза, като се смята, че доминиращото място за свързване с рецепторите е *pars tuberalis* (PT) – тънък слой на предната хипофиза, обхващащ дръжката и простиращ се рострално по вентралната повърхност на *eminentia mediana*. В днешно време се счита, че продължителността на мелатониновия сигнал (дълъг през зимата и кратък през лятото) задвижва фотопериодичния контрол върху разнообразните аспекти на невро-ендокринната физиология, включително – лактотрофо-репродуктивната ос чрез PT при възрастни бозайници (12).

Човешката репродуктивна способност, обаче, изглежда по-малко зависима от сезонните вариации в дължината на деня, но това не означава, че мелатонинът няма ефекти върху човешките репродуктивни органи. Всъщност, данните от последните две десетилетия сочат, че епифизарният индол се характеризира с множество директни ефекти върху гонадите и и техните аднекси при човека и другите бозайници (13).

По-специално, както стабилният циркадианен

ритъм, така и запазената цикличност в мелатониновата секреция са от изключителна важност за оптималната физиология на яйчниците, нормалното протичане на бременността и раждането. В тази връзка – светлината през нощта може да потисне среднощните маточни контракции по време на третия триместър на бременността. Доказателство за това са по-честите раждания през нощта в сравнение с тези през деня – отдава се значение на правилния мелатонинов ритъм при координирането на нощните контракции. От друга страна – жените с по-високи нощни мелатонинови нива показват по-мощни и координирани маточни контракции по време на раждането (13). Освен това хронобиологичните нарушения по време на бременността оказват негативни ефекти върху здравето на потомството, включващи метаболитни, сърдечно-съдови и когнитивни отклонения. В заключение – излагането на светлина през нощта несъмнено трябва да се избягва, тъй като е доказано, че то нарушава главния вътрешен циркадианен часовник, потискайки повишените нощни нива на мелатонина и индуцирайки изявата на различни видове заболявания (20).

Знае се, че мелатонинът може да се произвежда и от женските периферни репродуктивни органи, включително от гранулоза клетките, кумулус оофорус и ооцитите. Всички тези клетки могат да бъдат причина за наличието на трикратно по-високо съдържание на мелатонин във фоликуларната течност в сравнение с това в кръвния поток (29, 30). Доскоро се смяташе, че произходът на мелатонина във фоликуларната течност е вследствие натрупването му чрез процес на усвояване от кръвния серум. Съществуват доказателства, обаче, показващи, че специфични клетки в яйчниците (посочени по-горе) са в състояние да синтезират и освобождават във фоликуларната течност мелатонин (31).

Фактът, че интрафоликуларите концентрации на мелатонин при хора са два пъти по-високи в големите предовулаторни фоликули в сравение с по-малките антрални, незрели фоликули, подсказва, че повишените нива на мелатонина като мощен антиоксидант в периода на овулация биха били от голяма физиологична полза.

В настоящия научен обзор се представят актуални данни, доказващи силната положителна връзка между нивата на мелатонина във фоликуларната течност и качеството и количеството на ооцитите. Освен това, се изтъква специфичната роля на мелатонина във фоликуларната течност – нивата на мелатонина може да се разглеждат като маркер на яйчников резерв и предиктор за успеваемостта на предприетите *ин витро* техники за оплождане (32). В допълнение, при животински модели мелатонинът е в състояние да намали окислителното увреждане на гранулозните клетки (33). Смята се, че действието на индола като мощна антиоксидантна молекула е от изключително голяма важност, тъй като е известно, че гаметите и ембрионите при бозайниците са силно уязвими към въздействието на оксидативния стрес с наличие на високи липидни нива и възпаление с високо съдържание на свободни радикали. Накратко, хроничният възпалителен процес, идентифициран в яйчника по време на овулация, включва увеличен синтез на простагландини и цитокини, повишено активиране на протеолитични ензими и стимулирана капилярна пропускливост – всички свързани с по-високо производство на увреждащи реактивни кислородни видове. Освен това е известно, че макрофагите, левкоцитите и съдовите ендотелни клетки, намиращи се в непосредствена близост до големите фоликули, допринасят за производството на свободни радикали по време на руптурирането на фоликулите (34). Свободните радикали влияят на баланса между реакциите на окисление-редукция, нарушават двуслойната фосфолипидна симетрия на плазмената мембрана и засилват липидната пероксидация. Ето защо, за да се предпази яйчниковата тъкан от процеса на окисление по време на овулацията, повишаването на мелатониновите нива би гарантирало избягването на евентуална молекулярна увреда с резултат – развитие на здрав ембрион и плод. Така, последните научни данни показват, че мелатонинът е в състояние значително да подобри цитоплазменото зреене на ооцитите при експерименти с едър рогат добитък, повлиявайки благоприятно разпределението на органелите, увеличавайки вътреклетъчните нива на глутатиона и АТР, стимулирайки генната експресия на антиоксидантите и цялостно модулирайки т. нар. събития, свързани с оплождането. Крайният резултат е подобрен капацитет на фертилизация и способност за добро развитие на фетуса (35).

Терапевтични аспекти на мелатонина

Редица научни изследователи демонстрират, че експерименталното увреждане на ооцитите при миши модели, предизвикано от употре-бата на Бисфенол А (BPA – известен като мощен нарушител (дизруптор) на качеството на ооцитите при бозайници) може да претърпи обратно развитие чрез приложение на мелатонин *in vivo,* подобрявайки процеса на фертилизация чрез възстановяване на BP-индуцираните дефекти в протеините и събитията около процеса на оплождане.

не чрез намаляване нивата на ROS и инхибиране на апоптозата (36). В допълнение, скорошен научен труд показва, че мелатонинът може да се използва като специфичен фармакологичен агент при предотвратяване на репродуктивната токсичност, причинена от химични вещества, нарушаващи ендокринната система (напр. BPA) (37). И накрая е доказано, че мелатонинът може да модулира клетъчния скелет, подобрявайки физическата клетъчна резистентност (38).

Оплодителната способност при жените представлява непостоянна величина през репродуктивния период (от менархе до менопауза), като най-общо се характеризира с пик на около 25-годишна възраст и прогресивно редуциране след 35-тата година от живота. В днешно време поради настоящите културни и социални тенденции много от жените по света решават да забавят „своя момент" за концепция. През последните десетилетия възрастта за забременяване прогресивно се увеличава – процентът на жените, постигнали бременност на възраст > 30 г. се повишава от 5% през 1975 г. до около 26% през 2010 г. Следователно – повечето от тях, когато решават да заченат, са с изява на инфертилитет поради авансирал процес на яйчниково стареене (39).

По-нови данни, получени от изследвана индийска група от жени, потвърждават сигнификантната роля на по-младата възраст в процеса на оплождане, като подчертават особеното ѝ значение при използваните техники за in vitro фертилизация (40). От биологична гледна точка процесът на стареене на яйчниците се характеризира със спад във функцията на митохондриите и нарушаване на интегритета на цитоскелета (засяга се дължината на теломера, който се счита за биомаркер на клетъчното стареене и е силно чувствителен на оксидативни събития), намаляване на резерва от ооцити и увеличаване на броя на тези, характеризиращи се с по-ниско качество (41). От тази гледна точка митохондриите се възприемат за първични енергийни генератори – основен източник и таргетни органели за свободни радикали, като митохондриалният оксидативен стрес се счита за основен фактор, допринасящ за процеса на стареене. Последните данни от литературата ясно показват, че мелатонинът е в състояние значително да забави фертилния спад, свързан с репродуктивното стареене чрез подобряване както на качеството, така и на количеството на произвежданите ооцити. По-специално – мелатонинът проявява своя ефект, повлиявайки митохондриалното окислително увреждане (предотвратява окислението на кардиолипина – ключов компонент от митохондриалната мембрана) и възпирайки апоптозата, като в същото време опосредства запазването на оптималната митохондриална функция на стареещия яйчник и поддържането на дължината на теломерите в яйчниците на възрастни миши модели (7, 42). Така насочено срещу митохондриите, действието на мелатонина изглежда привлекателна перспектива за благоприятно повлияване на здравето и продължителността на живот, тъй като подмладяването на стареещите митохондрии би могло да бъде интересна стратегия за подобряване на общото благосъстояние (43).

Добре известно е, че затлъстяването при хората е свързано с неблагоприятна перспектива, касаеща репродуктивния спектър. Поради тази причина обезните животински модели са използвани в различни научни експерименти с цел демонстрация на това, че оралното приложение на мелатонин би могло значително да намали генерирането на ROS и сиртуини, както и да предотврати развитието на хромозомни аномалии и мейотични дефекти в ооцитите с краен резултат – по-здрави ембриони (44). Освен това е доказано, че суплементацията с мелатонин значително подобрява потенциала на ооцитната митохондриална мембрана, стимулира производството на ATP и предизвиква по-организирано разпределение на активни гранулирани митохондрии в зреещите ооцити (важен индекс на тяхното качество).

Особен интерес представляват скорошните данни за ролята на мелатонина в протектирането на ендоплазматичния ретикулум (ЕР) от вредното въздействие на окислението и последващо увреждане, като по този начин се постига предпазване на репродуктивните органи от преждевременно стареене. Например, намерено е, че интраперитонеалното инжектиране на липополизахариди при мишки може да забави интраутеринния растеж на фетуса и да доведе до настъпване на смърт. В допълнение, плацентата на тези бременни мишки се представя със значителен стрес за ЕР, който бива напълно преодолян при предварително приложение на мелатонин, изявяващ протективен ефект спрямо растежа и развитието на фетуса (45).

Недоброто качество на яйцеклетките е един от основните проблеми, налагащ прилагане на асистирана репродуктивна технология (АРТ). Като основен патогенетичен механизъм се спряга оксислителното увреждане на гаметата. В този ред на мисли присъствието на „очистители" на свободните радикали, както и на антиоксидантни ензими, които ги метаболизират до неактивни продукти, е от особено значение за протекцията на яйцеклетката от наличието на

оксидативен стрес. След като мелатонинът се смята за пряк активатор на „очистителите“ на свободните радикали, стимулатор на генната експресия и действието на антиоксидантните ензими, резонно е да се обмисли възможността за употребата на този индол в насока подобряване на качеството на човешките яйцеклетки, както при естествени условия, така и при АРТ. Всъщност, приложението на мелатонин при жени с инфертилитет и неуспешни опити за концепция при АРТ води до сигнификантно подобрение в процента на случаите с постигната фертилизация чрез редуциране степента на увреждащо въздействие на свободните радикали и увеличаване на броя на ооцитите, успели да достигнат матурация (46). В едно важно проучване се доказва, че инициирането на мелатонинова терапия преди АРТ и продължаването ѝ по време на бременността подобрява шансовете за успешна фертилизация, постигане и завършване на нормална бременност с близо 50% (47).

Данните от рандомизирано, контролирано, двойно-сляпо проучване показват, че суплементацията с мелатонин при пациентки със синдром на поликистозни яйчници (PCOS), подложени на in vitro фертилизация поради лошо качество на ооцитите, може значително да подобри качеството им и това на фетуса, действайки синергично с инозитола, изпълняващ също важна роля в репродукцията (48). Други научни резултати, получени при експериментални проучвания с животински модели на PCOS, демонстрират, че мелатонинът е способен да индуцира матурация на ядрата на ооцитите и да осигури нужния потенциал за нормална фертилизация (49). В тази насока са и инициираните голям брой проучвания, целящи извършване на по-подробна оценка на ефектите от приложението на мелатонин при млади жени, подложени на АРТ (50). Научното обследване на Hongwanyu и сътр. (51) се явява потвърждение на хипотезата, че пациентките с PCOS имат намалени концентрации на мелатонин във фоликулите.

След постигане на бременност, спонтанно или чрез АРТ, майчините мелатонинови нива прогресивно нарастват до времето на очаквания термин, за да осигурят така необходимите за формирането и диференциацията на мозъчните структури на фетуса високи нива на хормона.
Знае се, че серумните концентрации на мелатонина достигат своя пик през трети триместър – наблюдават се повече от двукратно повишени стойности в сравнение с тези при небременни жени, като впоследствие силно спадат до първоначалните си нива преди бременността на втория ден след раждането.

При наличие на патологична бременност нивата на мелатонина са доказано по-ниски след 32-та гестационна седмица. Майчиният мелатонин осигурява първия циркадианен сигнал на фетуса и е толкова важен заради добре известния си антиоксидантен протективен ефект. Затова ниският плазмен мелатонин или смутеният циркадианен ритъм (напр. при светлина през нощта) по време на бременността могат да доведат до нарушения в програмирането на феталния мозък с дългосрочни неблагоприятни ефекти. Патофизиологичната основа на тези резултати се свързва с индукцията на оксидативен стрес при бременности, усложнени например с гестационен захарен диабет, интраутеринна ретардация, прееклампсия, майчино недохранване и стрес. От тази гледна точка, потискането на майчиния циркадианен ритъм на мелатонина при продължително излагане на светлина през нощта по време на втората половина на бременността може да предизвика редица отклонения във феталното развитие, между които – интраутеринна ретардация, нарушен или потиснат ритъм на кортикостерона, нарушения в мозъчното развитие – всички те, наблюдавани при опити с животни. Така, работата на смени по време на бременност се асоциира с повишен риск от настъпване на спонтанен аборт, преждевременно раждане и/или раждане на малки за гестационната възраст деца (52). Съществуват нови данни, показващи, че лечението с мелатонин при усложнена бременност се явява ефективен терапевтичен подход, предпазващ фетуса от появата на мозъчни увреждания (53).

Антиоксидантните качества на мелатонина се демонстрират и на ниво плацента, където индолът се продуцира в големи количества и оказва протекция по отношение настъпване на молекулярно увреждане и клетъчна дисфункция вследствие локален оксидативен стрес. Съществуват проучвания, които доказват специфичната способност на плацентата да продуцира мелатонин по време на бременността (от 7 г.с. до очаквания термин) с максимална експресия около трети триместър. В допълнение, първичният вилозен цитотрофобласт се оказва, че притежава ключова роля в продукцията на плацентарен мелатонин, като *in vitro* приложената мелатонинова терапия може да индуцира увеличаване на секрецията на човешкия хориогонадо-тропин (чХГ), вероятно чрез връзката му с MT1- и MT2-мелатонинови рецептори, което от своя страна допринася за правилното функциониране на плацентата (54). Несъмнено е необходимо създаването на баланс между процесите на формиране и дегенерация на синцитиотрофобласта (произлизащ от пролиферацията на цитотро-

фобласта) с цел превенция на възникване на патологичен процес, засягащ плацентата, като в този ред на мисли мелатонинът може да се окаже с есенциално влияние върху създаването на стабилна хомеостаза между цитотрофобласт-синцитиотрофобласт. Всъщност, добре известно е, че индолът изпълнява важна регулаторна роля при настъпване на апоптозата, показвайки анти-апоптотични ефекти при нормалните клетки, и про-апоптотични такива при раковите клетки. Счита се, че тази функционална двойственост се използва от плацентата с цел поддържане на необходимия баланс между цито- и синцитиотрофобласта (55).

В научно проучване, използващо животински модели (крави) в средна и трета половина на бременността, изследователите демонстрират, че суплементацията с мелатонин увеличава умбиликалния артериален кръвоток, който преди това е бил редуциран поради ограничено хранене. Предполага се, че този специфичен отговор на умбиликалната артериална хемодинамика и феталното развитие, респективно, може да се медиира частично посредством връзка със съдовите мелатонинови рецептори (56).

Заслужава си да се отбележи, че приложението на мелатонин е способно да предотврати сериозни плацентарни и фетални промени и при бременни жени със захарен диабет (57).

На базата на гореизложените факти се разбира, че мелатонинът може да бъде използван като фармакологично средство. От тази гледна точка, възможността за екзогенно приложение на мелатонин с цел промяна на фазите на човешките циркадиани ритми е описано за първи път в средата на 80-те години (58). Способността на индола да се намесва в циркадианния ритъм в зависимост от биологичното време на приложение се е използвала при лечението на различни нарушения, свързани с десинхронизацията на цикъла сън/бодърстване. Установено е, че перорално приложение на мелатонин (0,3-5 mg/вечер) води до облекчение на симптомите при ситуации, свързани с рязка часова разлика (включително социална), както и при работа на смени.

Огромни усилия са съсредоточени в опити да се установи оптимален мелатонинов терапевтичен режим, като в момента се приема следният консенсус: мелатонинът трябва да бъде приеман винаги по едно и също време приблизително около 22,00 ч в определена индивидуална доза, постигаща синхронизиране на ритъма сън/бодърстване. Не трябва да се забравя, че нощният пик на мелатонина физиологично намалява с напредването на възрастта, което обяснява необходимостта от по-висока доза мелатонин при по-възрастните пациенти. Заслужава си да се отбележи, че приложението на мелатонин във високи дози при млади хора може да доведе до нарушения в съня като поява на кошмари и симптоми на махмурлук на следващата сутрин. Затова, изглежда, че мелатонин в количество около 1-2 мг на вечер е най-подходящ за постигане на резултат без изява на странични ефекти при по-младата популация. Когато става въпрос за т.нар. „часова разлика“, която основно засяга младите пациенти, е важно да се засегне въпросът за възможността за възникване на нарушения в циркадианния ритъм, намаляване на плазмените концентрации на мелатонина със съществуващ риск от поява на репродуктивни метаболитни, сърдечно-съдови и онкологични проблеми.

Ефективността на екзогенно прилагания мелатонин като синхронизиращ агент при нарушения на циркадианния ритъм е добре известна, като използването му с цел постигане на мощна антиоксидантна активност отваря широки перспективи, касаещи особено репродуктивната система. Очевидно е, че мелатонинът представлява съществена част от механизма, който физиологично регулира репродуктивната система, действайки върху всеки неин компонент. В допълнение, има доказателства, че не цялото количество мелатонин се продуцира от епифизата – намерено е, че периферните репродуктивни структури имат механизми за активна продукция на мелатонин с цел покриване на собствените си нужди. Митохондриите са способни да произвеждат мелатонин и следователно няма клетка в човешкия организъм, която да не синтезира този важен индол. Този факт обогатява познанията за повсеместните функции на мелатонина, които се делят на рецепторно-медиирани и такива, независими от рецептора. Това води до предположението, че индолът може да бъде от решаващо значение за поддържане не само на репродуктивното благосъстояние, но и на доброто здраве като цяло.

Нормалните физиологични ритми са важни за поддържането на стабилна среда за организма на майката, която би осигурила на плода серия от стимули, улесняващи пренаталното перцептивно обучение и развитието на негова подходяща вътрешна и външна среда. Като следствие – появата на циркадианни ритми, които вече при съществат по време на живота на плода като редовни повторения на идентични последователности (напр. цикли на светлина/тъмнина), може да му помогне да развие способността си да се адаптира към промяната в среда, характеризираща се със стриктна последователност. От тази гледна точка, мелатонинът, който играе основна роля в регулярността и синхронизирането на централните и периферни осцилации, позволявайки развитието на хармонично вътрешно функцио-

ниране и адаптиране на вътрешната среда към външната, се счита за най-добрия периферен биомаркер за нормалността на циркадианните ритми при човека. Поради тази причина, използването му, самостоятелно или като адювантна терапия, е силно препоръчително не само за запазване на доброто здраве като цяло, но и в конкретни случаи, например при нарушения в репродуктивна система и при млади, и при по-възрастни жени. Както бе посочено по-горе, приложението на мелатонин е в състояние да осигури по-високо качество на ооцитите и следователно да подобри резултатите от АРТ с последващо развитие на по-добри ембриони, фетуси и новородени.

Заключение

Историята на мелатонина, показваща ролята му на ефекивен терапевтичен агент, далеч не приключва до тук. Напротив – изглежда, че с напредването на науката клиничната му употреба става все по-широка, особено в областта на женската репродукция, където главните действащи лица са ооцитите, плацентата и ембрионът/плодът/новороденото. Всички те могат да бъдат благоприятствани от действието на оптимални количества мелатонин с цел коригиране на нарушенията в циркадианния ритъм и/или справяне с повишеното окислително увреждане на уязвимите телесни структури. От тази гледна точка, разширяването на употребата на мелатонина в рутинната клинична практика би могло да се възприеме като златен стандарт в превенцията и лечението на нарастващата по обем патология, като трябва да се вземе под внимание фактът, че ползата от този основен биогенен амин е свързана не само с постигането на репродуктивно благополучие, но и с подобряването на функцията, касаеща всички други тъкани и органи в човешкия организъм.

Благодарности: ***Редакционната колегия изказва благодарност за превода на обзора на д-р Даниела Колева-Тютюнджиева и д-р Екатерина Бабаджанова, Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, МУ, Пловдив.***

References

1. **Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W.** Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc 1958;* 80: 2587.

2. **Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougerou C.** Melatonin: Pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Curr Neuropharmacol 2017;* 15: 434-443.

3. **Cecon E, Oishi A, Jockers R.** Melatonin receptors: molecular pharmacology and signaling in the context of system bias. *Br J Pharmacol 2017;* doi: 10.1111/bph.13950.

4. **Mayo JC, Sainz RM, Gonzalez-Menendez P, Hevia D, Cernuda-Cernuda R.** Melatonin transport into mitochondria. *Cell Mol Life Sci 2017;* 74:3927-3940.

5. **Reiter RJ, Tan DX, Galano A.** Melatonin: exceeding expectations. *Physiology 2014;* 29:325-333.

6. **Manchester LC, Coto Montes A, Boga JA, Andersen LPH, Zhou Z, Galano A, et al.** Melatonin: An ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J Pineal Res 2015;* 59:403–419.

7. **Song C, Peng W, Yin S, Zhao J, Fu B, Zhang J, et al.** Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice. *Nature/Scientific Reports 2016;* 6:35165- 35180.

8. **He C, Wang J, Zhang Z, Yang M, Li Y, Tian X, et al.** Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte's quality under in vitro conditions. *Int J Mol Sci 2016;* 17:939-955.

9. **Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Zhou XJ, Xu B.** Mitochondria: central organelles for melatonin's antioxidant and anti-aging actions. *Molecules 2018;* 23: 509-534.

10. **Sharafati-Chaleshtori R, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M, Soltani A.** Melatonin and human mitochondrial diseases. *J Res Med Sci 2017;* 22: 2-17.

11. **Galano A, Tan DX, Reiter RJ.** Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage. *Molecules 2018; 23:* 530-566.

12. **Johnston JD, Skene DJ.** Regulation of mammalian neuroendocrine physiology and rhythms by melatonin. *J Endocrinol 2015;* 226:T187-T198.

13. **Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Manchester LC, Tan DX.** Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. *Int J Mol Sci 2013;* 14:7231-7272.

14. **Russart KLG, Nelson RJ.** Light at night as an environmental endocrine disruptor. *Physiol Behav 2017;* doi: 10.1016/j.physbeh.

15. **Zubidat AE, Haim A.** Artificial light-at-night - a novel lifestyle risk factor for metabolic disorder and cancer morbidity. *J Basic Clin Physiol Pharmacol 2017;* 28:295-313.

16. **Mortazavi SAR, Mortazavi SMJ.** Women with hereditary breast cancer predispositions should avoid using their smartphones, tablets, and laptops at night. *Iran J Basic Med Sci 2018;* 21:112-115.

17. **Leproult R, Holmbäck U, van Cauter E.** Circadian misalignment augments markers of insulin resistance and inflammation, independently of sleep loss. ***Diabetes 2014;*** 63:1860–1869.

18. **Lin PC, Hung HC, Pan SM, Wu MT.** The change of oxidative DNA damage in nurses with shift work. *Occup Environ Med 2014;* 71, A97.

19. **Touitou Y, Touitou D, Reinberg A.** Disruption of adolescents' circadian clock: The vicious circle of media use, exposure to light at night, sleep loss and risk behaviors. *J Physiol Paris 2017;* doi: 10.1016/j.jphysparis.

20. **Bonmati-Carrion MA, Arguelles-Prieto R, Martinez-Madrid MJ, Reiter RJ, Hardeland R, Rol MA, Madrid JA.** Protecting the melatonin rhythm through circadian healthy light exposure. *Int J Mol Sci 2014;* 15: 23448-23500.

21. **Omidvar S, Bakhtiari A, Firouzbakht M, Amiri FN, Begum K.** Perceived health discomfort among adolescent girls and related factors in an urban area, South India. *J Educ Health Promot 2017;* 6:86-94.

22. **Akacem LD, Wright KPJr, LeBourgeois MK.** Sensitivity of the circadian system to evening bright light in preschool-age children. *Physiol Rep 2018;* 6:1-10.

23. **Menendez-Velazquez A, Morales D, Garcia-Delgado AB.** Light Pollution and Circadian Misalignment: A Healthy, Blue-Free, White Light-Emitting Diode to Avoid Chronodisruption. *Int J Environ Res Public Health 2022;* 19:1849.

References

24. **Wei Y, Haiying M, Man N, Teng G, Ye Z, Liying H, et al.** Roles of melatonin in the field of reproductive medicine. *Biomed Pharmacother 2021;* 144:112001.

25. **Moralia MA, Quignon C, Simonneaux M, Simonneaux V.** Environmental disruption of reproductive rhythms. *Front Neuro - endocrinol 2022;* 66:100990.

26. **Tsutsui K, Takayoshi U, Ukena K.** Advancing reproductive neuroendocrinology through research on the regulation of GnIH and on its diverse actions on reproductive physiology and behavior. *Frontiers Neuroendocrinol 2022;* 64:10955.

27. **Rudolph LM, Bentley GE, Calandra RS, Paredes AH, Tesone M, Wu TJ, Micevych PE.** Peripheral and central mechanisms involved in the hormonal control of male and female reproduction. *J Neuroendocrinol 2016;* 28:1-23.

28. **Emet M, Ozcan H, Ozel L, Yayla M, Halici Z, Hacimuftuoglu A.** A review of melatonin, its receptors and drugs. *Eurasian J Med 2016;* 48:135-141.

29. **Brzezinski A, Seibel MM, Lynch HJ, Deng M, Wurtman RJ.** Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab 1987;* 64:865–867.

30. **Ronnberg L, Kauppila A, Leppaluoto J, Martikainen H, Vakkuri O.** Circadian and seasonal variation in human preovulatory fluid melatonin concentration. *J Clin Endocrinol Metab 1990;* 71:492-496.

31. **Tenorio FCAM, Simoes MJ, Teixeira VW, Teixeira AAC.** Effects of melatonin and prolactin in reproduction: review of literature. *Rev Assoc Med Bras 2015;* 61:269-274.

32. **Tong J, Sheng S, Sun Y, Li H, Li WP, Zhang C, Chen ZJ.** Melatonin levels in follicular fluid as markers for IVF outcomes and predicting ovarian reserve. *Reproduction 2017;* 153:443-451.

33. **Cao Y, Shen M, Jiang Y, Sun SC, Liu H.** Melatonin reduces oxidative damage in mouse granulosa cells via restraining JNK-dependent autophagy. *Reproduction 2018;* 155:307-319.

34. **Vitale SG, Rossetti P, Corrado F, Rapisarda AMC, La Vignera S, Condorelli RA, et al.** How to achieve high-quality oocytes? The key role of myoinositol and melatonin. *Int J Endocrinol 2016;* 2016:4987436.

35. **Zhao Xm, Wang N, Hao HS, Li CY, Zhao YH, Yan CL, et al.** Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. *J Pineal Res 2017; e12445.* doi.org/10.1111/jpi.12445.

36. **Zhang M, Dai X, Lu Y, Miao Y, Zhou C, Cui Z, et al.** Melatonin protects oocyte quality from Bisphenol A-induced deterioration in mouse. *J Pineal Res 2017;* 62: e12396. doi.org/10.1111/jpi.12396.

37. **Wu G, Song D, Wei Q, Xing J, Shi X, Shi F.** Melatonin mitigates bisphenol A-induced estradiol production and proliferation by porcine ovarian granulosa cells in vitro. *Anim Reprod Sci 2018;* doi: 10.1016/j.anireprosci.

38. **Benitez-King G, Soto-Vega E, Dominguez-Rodriguez G.** Melatonin modulates microfilament phenotypes in epithelial cells: Implications for adhesion and inhibition of cancer cell migration. *Histol Histopathol 2009;* 24:789-799.

39. **Hamilton BE, Martin JA, Ventura SJ.** Births: preliminary data for 2010. *National Vital Statistics Reports 2011;* 60:1-25.

40. **Dua M, Bhatia V, Malik S, Prakash V.** ART outcome in young women with premature ovarian aging. *J Midlife Health 2013;* 4:230-232.

41. **Kalmbach KH, Antunes DM, Kohlrausch F, Keefe DL.** Telomeres and Female Reproductive Aging. *Seminars in reproductive medicine 2015;* 33:389-395.

42. **Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G.** Mitochondrial bioenergetics decay in aging: beneficial effect of melatonin. *Cell Mo. Life Sci 2017;* 74:3897-3911.

43. **Theurey P, Pizzo P.** The aging mitochondria. *Genes 2018;* 9:1-13.

44. **Han L, Wang H, Li L, Li X, Ge J, Reiter RJ, Wang Q.** Melatonin protects against maternal obesity-associated oxidative stress and meiotic defects in oocytes via the SIRT3-SOD2-dependent pathway. *J Pineal Res 2017;* doi: 10.1111/jpi.12431.

45. **Wei H, Zhiqiang M, Shouyin D, Shuai J, Yue L, Chongxi F, et al.** Snapshot: implications for melatonin in endoplasmic reticulum homeostasis. *Br J Pharmacol 2016;* 173: 3431-3442.

46. **Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, et al.** Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res 2008;* 44:280–287.

47. **Unfer V, Raffone E, Rizzo P, Buffo S.** Effect of a supplementation with myo-inositol plus melatonin on oocyte quality in women who failed to conceive in previous in vitro fertilization cycles for poor oocyte quality: a prospective, longitudinal, cohort study. *Gynecol Endocrinol 2011;* 27:857-861.

48. **Pacchiarotti A, Carlomagno G, Antonini G, Pacchiarotti A.** Effect of myo-inositol and melatonin versus myo-inositol, in a randomized controlled trial, for improving in vitro fertilization of patients with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol 2016;* 32:69-73.

49. **Nikmard F, Hosseini E, Bakhtivari M, Ashrafi M, Amidi F, Aflatoonian R.** Effects of melatonin on oocytes maturation in PCOS mouse model. *Anim Sci J 2017;* 88:586-592.

50. **Choi DH.** Melatonin study between diminished and normal responder in IVF. *Clinical Trials.gov Identifier 2017;* NCT03117725.

51. **Hongwanyu L, Mei L, Cong Z.** Women with polycystic ovary syndrome (PCOS) have reduced melatonin concentrations in their follicles and have mild sleep disturbances. *BMC Womens Health 2022;* 22:79.

52. **Voiculescu SE, Zygouropoulos N, Zahiu CD, Zagrean AM.** Role of melatonin in embryo fetal development. *J Med Life 2014; 7:*488-492.

53. **Sagrillo-Fagundes L, Assuncao Sallustiano EM, Yen PW, Vaillancourt C.** Melatonin in pregnancy: Effects on brain development and CNS programming disorders. *Curr Pharm Des 2016;* 22:978-986.

54. **Soliman A, Lacasse AA, Lanoix D, Sagrillo-Fagundes L, Boulard V, Vaillancourt C.** Placental melatonin system is present throughout pregnancy and regulates villous trophoblast differentiation. *J Pineal Res 2015;* 59:38-46.

55. **Lanoix D, Lacasse AA, Reiter RJ, Vaillancourt C.** Melatonin, the smart killer: The human trophoblast as a model. Mol *Cell Endocrinol 2012;* 348:1–11.

56. **Lemley CO, Vonnahme KA.** Physiology and endocrinology symposium: alterations in uteroplacental hemodynamics during melatonin supplementation in sheep and cattle. *J Anim Sci 2017; 95:*2211-2221.

57. **Ferreira de Melo IM, Martins Ferreira CG, Alves ER, D'Assunção CG, Cavalcanti Lapa Neto CJ, Lima de Albuquerque YM, et al.** Melatonin Administration Prevents Placental and Fetal Changes Induced by Gestational Diabetes. *Reprod Sci 2022;* 29:1111-1123.

58. **Arendt J, Bojkowski C, Folkard S, Franey C, Marks V, Minors D, et al.** Some effects of melatonin and the control of its secretion in humans. *Ciba Foundation Symposium 1985;* 117:266–283.

Address for correspondence:

Prof. Maurizio Nordio,

Department
of Experimental Medicine,
University „Sapienza“, Rome, Italy
e-mail: maurizionordio1@gmail.com

Нарушения в тиреоидната ос и хормони при хронична обструктивна белодробна болест

Мeков, Евгени В.[1], Боянов, Михаил А.[2]
[1] УМБАЛ „Св. Ив. Рилски“; Катедра по професионални болести, Медицински Факултет, Медицински Университет, София
[2] УМБАЛ „Александровска“; Катедра по вътрешни болести, Медицински Факултет, Медицински Университет, София

Постъпване: 08. 05. 2022/Приемане: 10. 05. 2022

Changes in the Thyroid Axis and Hormones in Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Mekov, Evgeni V.[1], Boyanov, Mihail A.[2]
[1] University Hospital „Sv. Ivan Rilski“; Department of Occupational Diseases, Faculty of Medicine, Medical University, Sofia
[2] University Hospital „Alexandrovska“; Department Internal Medicine, Faculty of Medicine, Medical University, Sofia

Submitted: 08. 05. 2022/Accepted: 10. 05. 2022

Резюме

Хроничната обструктивна белодробна болест (ХОББ) е една от водещите причини за заболеваемост и смъртност в световен мащаб. Нарушенията в нивата на щитовидните хормони са по-чести при пациенти с ХОББ в сравнение с общата популация.

Целта на настоящата обзорна статия е да покаже някои от наличните данни за промените в хипоталамо-хипофизно-тиреоидната ос при ХОББ. Синдромът на болест с нетиреоиден произход (NTIS) е най-често наблюдаваното отклонение на щитовидните хормони при пациенти с ХОББ, следван на второ място от хипотиреоидизма. Промените в хормоните и клиничната дисфункция на щитовидната жлеза са свързани с по-лоши клинични резултати при пациентите с ХОББ като например по-чести екзацербации и по-продължителна интубация. За разграничаване на NTIS от органична болест на щитовидната жлеза е необходим разширен лабораторен панел, включващ тиреоидни антитела и евентуално ехографско изследване на жлезата. Не е ясно дали NTIS е реакция на

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. Thyroid test abnormalities are more common in patients with COPD than in the general population. The aim of this review is to discuss the available data on changes of the pituitary-thyroid axis in COPD. Non-Thyroidal Illness Syndrome (NTIS) is by far the most frequent abnormality in thyroid function tests (TFTs) patients with COPD, followed by hypothyroidism. Abnormal TFTs and thyroid dysfunction are associated with poorer clinical outcomes in patients with COPD, i.e. frequent exacerbations and longer weaning periods if intubated. The differentiation of NTIS from thyroid disease requires extensive lab tests including thyroid antibodies as well as thyroid ultrasound.

It is still unclear whether NTIS is an adaptation or maladaptation syndrome. It is not certain whether a specific treatment is really indicated unlike true hyper – or hypothyroidism. Proper

адаптация на организма или обратно – на маладаптация. Все още е обект на дискусия и дали следва да бъде лекуван, за разлика от истинския хипер- или хипотиреоидизъм. Правилната терапия, обаче, повлиява негативните последици, както при пациенти с хипотиреоидизъм, така и при такива с хипертиреоидизъм.

Ключови думи:

ХОББ; щитовидна жлеза; коморбидност; хипотиреоидизъм; хипертиреоидизъм; тиреоидна дисфункция при нетиреоидни заболявания

treatment in patients with hypo- or hypothyroidism, however, may revert negative consequences.

Key words:

COPD; thyroid; comorbidity; hypothyroidism; hyperthyroidism; non-thyroidal illness syndrome (NTIS)

Въведение

Хроничната обструктивна белодробна болест (ХОББ) е сред водещите причини за заболеваемост и смъртност в световен мащаб (1,2). Общата болестност в световен мащаб през 2010 г. се оценява на 11,7% сред лицата над 30-годишна възраст, като се отчита увеличение с 68.9% спрямо 1990 г. (1). Човешките загуби, включително и от сериозно влошено качество на живот, са много високи (2). Публикувани са специфични за Централна и Източна Европа методични указания за поведение при ХОББ (3). Критична оценка на 426 български пациенти с ХОББ установява висока относителна честота на тежките случаи, както и голяма социално-икономическа тежест на самото заболяване (4). Причините за това се търсят сред високото разпространение на тютюнопушенето у нас, сред факторите на околната среда и сред особеностите на здравеопазната система. Сто от всичките 426 участници (23,5%) са имали ендокринна коморбидност, а 32 – метаболитни придружаващи заболявания (4). Логично следва да се очаква, че най-честите ендокринни коморбидности вероятно са захарният диабет (дисгликемията) и промените в щитовидните хормони.

ХОББ представлява тежко хронично заболяване с чести епизоди на обостряне (остри екзацербации). Пациентите имат често хипоксемия и/или хиперкапния, налице е локално и/или системно възпаление (повишени цитокини), прилагат се медикаменти като например глюкокортикоиди, които влияят на хормоналния баланс на организма. Честите хоспитализации въвеждат допълнителен остър стресов елемент. Всички тези фактори влияят на нивата на тиреоидните хормони и функционална динамика и стават причина подобни отклонения да се откриват по-често при ХОББ, отколкото в общото население (5,6). От своя страна, промените в щитовидните хормони и цялостната хипоталамо-хипофизно-щитовидна ос имат потенциал да модулират хода на основното заболяване (ХОББ). Настоящият обзор има за цел да коментира някои от важните клинични аспекти на двупосочното взаимодействие „ХОББ ↔ щитовидна жлеза".

Синдром на болест от нетиреоиден произход (NTIS) – кратко представяне

Промените в тиреоидната хомеостаза при ХОББ най-често са по типа на така наречения *„синдром на болест от нетиреоиден произход"* (7-9). Той е описан за първи път през 70-те години на миналия век като ансамбъл от промени в нивата на щитовидните хормони в резултат от наличие на друго сериозно заболяване (8). В началото е въведено понятието *„синдром на ниския T_3"* (low T_3 syndrome), впоследствие в Международната класификация на болестите (МКБ 10) е предпочетен терминът *„синдром на болест с еутиреоидизъм"* (код E 7,8; euthyroid sick syndrome). Най-актуалният в момента термин е *„синдром на болест от нетиреоиден произход"* (Non-Thyroidal Illness Syndrome, NTIS) (7).

NTIS обхваща различни степени и обхват на промени в тиреоидните хормони – изолирано понижение на fT_3 (обичайна начална находка), едновременно понижение на fT_3 и fT_4 при нормално ТСХ (при задълбочаване на промените) до понижение на периферните хормони и ТСХ (в напредналите стадий на NTIS) (7). Подходящ модел за изучаване на синдрома представляват

болните в интензивните отделения (9). Острите тежки състояния се доминират от нарушение в свързването на щитовидните хормони с транспортните протеини, понижена експресия и активност на дейодиназа 1 (понижена конверсия на T_4 в T_3), повишена активност на дейодиназа 3 (повишена конверсия в обратен T_3, вместо в активния Т3) и понижено поемане на тиреоидни хормони от тъканите. Всичко това се случва на фона и на известно недохранване на пациента и се разглежда като полезна адаптация на организма срещу прекомерен катаболизъм. В хроничната фаза на тежкото системно заболяване водещо е потискането на хипоталамо-хипофизната секреция на тиреотропен-рилизинг хормон и ТСХ, докато на периферно тъканно ниво е повишена експресията на вътреклетъчни рецептори (например на MCT8), на ядрени рецептори за тиреоидните хормони, заедно с повишена активност на дейодиназа 2 (повишена конверсия в T_3 на ниво хипоталамус-хипофиза). Спори се относно биологичния смисъл на тези промени, но част от авторите считат, че те са адаптационни, а не маладаптационни. По принцип, силните и продължителни понижения на периферните хормони и ТСХ в рамките на NTIS се интерпретират като неблагоприятен прогностичен признак за повишена болестност и смъртност (8,9). Обсъжда се и хипотеза за развитие на „вътреклетъчен хипотиреоидизъм" на фона на NTIS, но тя трудно може да се докаже, тъй като маркерите за тъканно въздействие на тиреоидните хормони (като натриуретичните пептиди от сърцето, кръстосаните колагенови връзки от костите или специфични глобулини от черния дроб) могат да бъдат променени заради самия ХОББ или коморбидностите (например сърдечна увреда).

Доброто познаване на промените при NTIS е важно за отграничаването му от истинско заболяване на щитовидната жлеза (предшестващо или новопоявило се). За диференциалната диагноза от важно значение е снемането на пълна анамнеза, провеждането на ехографско изследване на щитовидната жлеза и евентуално изследване на тиреоидния автоимунитет. Допълнително затруднение може да създаде фактът, че в периодите на реконвалесценция изходно нормалното или понижено ниво на ТСХ може да се повиши и тогава е важно отграничаването от истински хипотиреоидизъм. При прочита на литературата трябва да се има предвид и фактът, че в част от публикациите по темата ХОББ авторите не са ендокринолози и често използват термина „тиреоидна дисфункция", без да е налице образно изследване на тиреоидеята и без изключване на тиреоиден автоимунитет (10,11). А всъщност се има предвид далеч по общото понятие „промени в нивата на тиреоидните хормони" (12,13).

По отношение на евентуалното лечение на „вътреклетъчния" хипотиреоидизъм при NTIS въобще няма достатъчно данни за евентуални ползи. Рандомизираните проучвания, обект на последващи анализи, са много малко и са главно в областта на кардиологията, кардиохирургията и интензивната медицина (9). Почти половината от тях са прилагали трийодтиронин, останалата – тироксин.

Честота на проблема „променени тиреоидни хормони" при ХОББ

Проучванията в тази област започват през 80-те години на миналия век, едновременно със стандартизиране на измерванията на тиреоидните хормони в кръвта. Първите проучвания са и върху много малки пациентски колективи (13). Едно от малкото проучвания, в които са прилагани и ехография или сцинтиграфия на щитовидната жлеза, датира от 2004 г. и сравнява 32 пациенти със стабилна ХОББ и 15 здрави контроли (12). В това проучване тиреоидните хормони са били в референтни граници при всички пациенти, но все пак нивата на fT_3 са били по-високи при пациентите в сравнение с контролите, докато ТСХ и fT_4 не са се различавали значимо (12). Съвременните проучвания също не са особено големи по брой участници. Две скорошни публикации от Индия изучават проблема (10,11). В първото участват 50 пациенти с новодиагностицирана ХОББ, от които 36 (72%) са имали умерено по тежест заболяване, а останалите 14 (28%) – тежка форма (10). Осемнадесет (36%) са имали нормални нива на тиреоидните хормони, 27 (54%) – изявен хипотиреоидизъм и 10% – субклиничен хипотиреоидизъм. Честотата на промяна в тиреоидните хормони е била по-висока при пациентите с тежък ХОББ – 71,4% с изявен хипотиреоидизъм и 14,3% – със субклиничен (10). Второто проучване обхваща 171 пациенти с ХОББ (11). Авторите докладват тиреоидна дисфункция при 43 пациенти (25%) и то само хипотиреоидизъм. Честотата му е била значимо по-висока при участниците в степен 4 по GOLD като тиреоидната дисфункция се е асоциирала с по-чести изостряния (11). Турски екип изследва 309 пациенти със стабилна ХОББ (от които 297 мъже) и открива щитовидна болест в 68 (22%) от тях (14). Хипотиреоидизъм са имали 7 участника (2%), хипертиреоидизъм – 16 души (5%), а 45 (15%) са били еутиреоидни.

Авторите заключават, че най-често срещаните заболявания на щитовидната жлеза в тяхното проучване са нетоксична (еутиреоидна) нодозна гуша, синдром на болест с еутиреоидизъм и токсична нодозна гуша (14).

По друг начин стоят нещата при пациенти с тежки форми на болестта или с хоспитализация по повод обостряне на ХОББ. В проучване на I. Dimopolou и сътр. се открива връзка между тежестта на болестта, степента на хипоксемия и променения метаболизъм на периферните тиреоидни хормони (15). В едно често цитирано проучване F. Karadag и сътр. оценяват 83 пациенти със стабилна ХОББ, 20 пациенти с обостряне и 30 здрави контроли (16). В стабилната подгрупа те диагностицират 10% със същинска болест на щитовидната жлеза, 20% с NTIS и 70% – без тиреоидни нарушения. При пациентите във фаза на обостряне процентите са обратни: 20% имат щитовидна болест, 70% – NTIS и само 10% нямат тиреоидни отклонения. При тежка ХОББ те наблюдават по-ниски нива на общ T_3 и съотношение T_3/T_4 (15). Нивата на тиреоидните хормони се променят и при наличие на дихателна недостатъчност. При сравнение на 65 пациента с ХОББ и дихателна недостатъчност и 18 с ХОББ, но без дихателна недостатъчност, промени в нивата на тиреоидните хормони са документирани при 52,3% от първата подгрупа и при 44,4% – във втората (без дихателна недостатъчност) (17). Сред 134 пациенти, хоспитализирани по повод ХОББ, D. Huang и сътр. откриват отклонения в тиреоидните хормони при 26,9% от тях (18).

По друг начин стоят нещата при пациенти с тежки форми на болестта или с хоспитализация по повод обостряне на ХОББ. В проучване на I. Dimopolou и сътр. се открива връзка между тежестта на болестта, степента на хипоксемия и променения метаболизъм на периферните тиреоидни хормони (15). В едно често цитирано проучване F. Karadag и сътр. оценяват 83 пациенти със стабилна ХОББ, 20 пациенти с обостряне и 30 здрави контроли (16). В стабилната подгрупа те диагностицират 10% със същинска болест на щитовидната жлеза, 20% с NTIS и 70% – без тиреоидни нарушения. При пациентите във фаза на обостряне процентите са обратни: 20% имат щитовидна болест, 70% – NTIS и само 10% нямат тиреоидни отклонения. При тежка ХОББ те наблюдават по-ниски нива на общ T_3 и съотношение T_3/T_4 (15). Нивата на тиреоидните хормони се променят и при наличие на дихателна недостатъчност. При сравнение на 65 пациента с ХОББ и дихателна недостатъчност и 18 с ХОББ, но без дихателна недостатъчност, промени в нивата на тиреоидните хормони са документирани при 52,3% от първата подгрупа и при 44,4% – във втората (без дихателна недостатъчност) (17). Сред 134 пациенти, хоспитализирани по повод ХОББ, D. Huang и сътр. откриват отклонения в тиреоидните хормони при 26,9% от тях (18).

В обобщение на цитираните проучвания може да се каже, че честотата и степента на отклоненията в тиреоидните хормони при ХОББ зависят от много фактори и вероятно такива отклонения се срещат в до 20% от пациентите в стабилна фаза и в до 70% във фаза на обостряне, хоспитализация или интензивно реанимационно лечение. Възможно е и честотата на органична тиреоидна болест да е по-висока в сравнение с общото население, но малките засега проучвания не позволяват сигурен извод по този въпрос.

Връзка на нивата на тиреоидните хормони с параметрите на белодробната функция и евентуалната прогноза при ХОББ

Проучванията, които търсят корелации между параметрите на дишането (основно спирометрия), кръвно-газовия анализ и тиреоидните хормони са доста многобройни, но резултатите им са и доста разнопосочни (12,13,15,16,18-21). В цитирано вече проучване върху 32 пациенти със стабилна ХОББ нивата на fT_3 са корелирали положително със стойностите на виталния и форсирания витален капацитет, ФЕО1 и парциалното налягане на кислорода (PaO_2), докато единствената отрицателна корелация е била с парциалното налягане на въглеродния двуокис, $PaCO_2$ (12). Или обобщено, влошените белодробни функция и газообмен корелират с ниски нива на активния fT_3 (12). В проучването на I. Dimopolou и сътр. при напълно компенсираните пациенти с ХОББ (ФЕО1 > 50%) не е имало връзка между параметрите на основното заболяване и тиреоидните хормони, докато при лицата с ФЕО1 < 50% е била налице силна положителна корелация между PaO_2 и съотношението на общите T_3/T_4 (15). Затова и те отдават водеща роля на хипоксемията, която повлиява метаболизма на тиреоидните хормони (15). В проучването на F. Karadag и сътр. най-големите понижения на ТСХ, fT_3 и съотношение T_3/T_4 са били при пациентите с тежка хипоксемия (16). Така те правят известно разграничение на влиянието на отделните фактори като тежестта на болестта влияе повече на съотношението T_3/T_4, докато хипоксемията има доста по-изразено

влияние върху периферните хормони и ТСХ. Интересна в това проучване е липсата на каквато и да е било връзка на тиреоидните хормони с хиперкапнията (16). В проучването на D. Huang и сътр. при хоспитализирани по време на обостряне пациенти не е установена връзка между тиреоидните хормони и нивата на PaO_2 или $PaCO_2$ (18). Нивата на ТСХ и fT_3 обаче са корелирали положително с ФЕО1 (r=0,329 и r=0,192). При това спирометричните показатели са били по-добри в подгрупата с нормални тиреоидни хормони в сравнение с тази с абнормни нива. Авторите заключават, че запазеният форсиран витален капацитет се явява протективен фактор, асоцииран с понижена честота на отклонения в тиреоидните хормони (18). В друго проучване при 132 хоспитализирани по повод обостряне пациенти с ХОББ е установена 55% честота на NTIS като най-честото отклонение е било понижение на ТСХ (19). Пациентите с NTIS са имали значимо по-ниски нива на PaO_2 и по-ниска сатурация и са отчетени положителна връзка между fT_4 и PaO_2 (r=0,313) и отрицателна между fT3 и $PaCO_2$ (r=-0,183). Авторите стигат до заключението, че хипоксемията води до функционални нарушения на оста хипоталамус-хипофиза-щитовидна жлеза, докато хиперкапнията влияе основно на секрецията и конверсията на периферните хормони (19).

Интерес представляват и данните при пациенти с ХОББ на механична вентилация (тоест с възможно най-тежките нарушения). Z. Yasar и сътр. описват 125 подобни пациенти, лекувани в интензивни отделения и установяват наличие на NTIS при 61 от тях (48,8%) (20). Тези пациенти са имали по-лоши скорове по APACHE II, по-дълъг период на отвикване от механична вентилация и по-висока честота на белодробни инфекции. Удължената нужда от механична вентилация е корелирала с нивата на fT_3 (20). C. Terzano и сътр. описват 168 пациенти с ХОББ, насочени към клинично звено, и категоризират 33 от тях (19,6%) като случаи на изявен хипотиреоидизъм, 22 (13%) – като субклиничен хипотиреоидизъм и 48 (28,6%) – като хипертиреоидни (21). При хипотиреоидните пациенти са описани по-ниски нива на PaO_2 и по-високи на $PaCO_2$, като е била налице и отрицателна корелация между PaO_2 и ТСХ. При тях са били по-ниски и максималните инспираторни налягания (MIP), а максималните експираторни налягания (MEP) са корелирали с ТСХ (21).

В обобщение може да се каже, че по-тежките форми на ХОББ се характеризират с променени нива на тиреоидните хормони и влошени параметри на дишането и кръвно-газовия обмен.

Най-силният общ фактор е самото основно заболяване ХОББ. Вероятно е налице и допълнителна пряка връзка тиреоидни хормони – дихателна функция/газообмен, която влияе по обратен път на основното заболяване.

Патофизиологична обосновка на връзката между наличието и протичането на ХОББ и тиреоидните хормони

Тази връзка може да се разглежда двупосочно. От една страна – как основното заболяване (ХОББ) повлиява секрецията, метаболизма и действието на тиреоидните хормони и тиреоидната ос в нейната цялост. От друга страна – как промененитe тиреоидни хормони и по-специално хипотиреоидизмът или хипертиреоидизмът влияят на дихателната функция, газообмена и общата прогноза при ХОББ. За по-добро разбиране на публикуваните факти трябва да се припомни и хипотезата за синдрома NTIS като състояние на „вътреклетъчен хипотиреоидизъм“ (21,22).

Как наличието и протичането на ХОББ променя тиреоидната ос

Редица фактори биха могли да обяснят асоциацията между ХОББ (и обостренията) и променената функция на щитовидната жлеза. Сред най-често обсъжданите фактори, чрез които ХОББ променя тиреоидната функция, са хроничното възпаление, тютюнопушенето, хипоксията и прилаганите медикаменти за повлияване на белодробния процес.

Хроничното възпаление при ХОББ се свързва с производството на интерлевкин (IL)-1b, тумор некротичен фактор (TNF)-α, IL-8, IL-6 и фибриноген от алвеоларните макрофаги и неутрофили (23-25). Нивата на цитокините са по-високи при пациенти с ХОББ в сравнение с контролна група без ХОББ както в стабилно състояние, така и при обостряне. Бактериалната суперинфекция логично стимулира проинфламаторната секреция, а някои патогени биха могли да упражняват и молекулярна мимикрия по отношение на щитовидната жлеза. Смята се, че възпалителните цитокини повлияват всички нива на тиреоидната ос. На ниво хипоталамус те повлияват невромедиацията и понижават производството на TPX като допълнително обуславят „цитокин-индуцираното усещане за болест“ (25). Освен това понижават синтеза и секрецията на щитовидните хормони, на тироксин-свързващия глобулин, както и конверсията на T_4 в T_3 (23,24). Интравенозното приложение на рекомбинантен IL-6 води до остро намаляване на нивата на T_3 и ТСХ (26). Установена е правопропорционална корелация между IL-6 и общия трийодтиронин (TT_3) и отношението TT_3/TT_4 при стабилни пациенти (16).

Тютюневият дим съдържа значително количество свободни радикали, които могат да увредят структурата на дихателните пътища и да стимулират възпалението. Цигарешният дим привлича активирани възпалителни клетки към белите дробове – друг източник на свободни радикали и оксиданти, допринасящи за дълготрайно възпаление (27). Ендокринната система не е инертна към компонентите на цигарения дим (28). По-високи нива на серумен общ трийодтиронин (TT_3) са открити при млади здрави пушачи в сравнение с непушачи, което предполага, че тютюнопушенето действа независимо от наличието на ХОББ (28).

Хроничната хипоксемия е друг често цитиран фактор. Обсъжда се евентуалното ѝ влияние върху отговора на ТСХ към ТРХ, както и върху периферната конверсия на T_4 в T_3 (15,18). Интересен е фактът, че хиперкапнията, изглежда, има много по-малка роля в този вид нарушения, вероятно и защото най-решаващото нарушение е това в окислителните вериги и митохондриалното дишане (под влияние на хипоксемията и хипоксията). Тези факти подчертават и участието на окислителния стрес като „обичайния виновник" в патологичните процеси при ХОББ. Проучване по този въпрос публикуват A. Mancini и сътр. (29). Те изследват липофилния коензим Q10 и общия антиоксидантен капацитет при 32 болни с ХОББ и 45 здрави контроли и доказват повишен окислителен стрес при пациентите с ниски нива на fT3 като правят извод и за съучастие на fT_3 в модулирането на антиоксидантните системи (29).

Нарушената конверсия на T_4 в T_3 при ХОББ се обяснява с различни фактори. Една от по-старите хипотези привлича като виновник повишените серумни нива на свободни мастни киселини при тежки заболявания с катаболизъм. Те са доказан инхибитор на екстратиреоидната конверсия на T_4 в T_3, както и на свързването на тиреоидните хормони към транспортните протеини (30). По-съвременни хипотези извеждат напред промените в дейодиназите, по-специално тип 1 (активиращ ензим, намиращ се в щитовидната жлеза, бъбреците, лимфоцитите и много други тъкани) и тип 3 (дезактивиращ ензим, експресиран в плацента, лимфоцити и много други) (24,31,32). Проучване открива повишени серумни нива на дейодинази тип 1 и тип 3 при 50 пациенти с ХОББ в сравнение с 30 контроли (31). От друга страна, повишението на проинфламаторните цитокини понижава експресията на дейодиназа тип 1 и така понижава производството на T_3 (24). В допълнение, има доказателства, че тип 3 дейодиназа се експресира усилено в гранулоцитите по време на бактериална инфекция, като така се генерират локално йодиди с потенциална бактерицидна и очистваща функция (32). А това от своя страна подчертава ролята на бактериалната инфекция в цялостната патогенеза на процеса.

Редица медикаменти могат да променят взаимовръзките по оста хипоталамус-хипофиза. Сред тях задължително трябва да се споменат глюкортикоидите и допаминът. Въздействията на глюкортикоидите са известни много отдавна и на тях няма да се спираме в детайли – главно потискане на ТСХ и на конверсията на T_4 в T_3 (33,34). Допаминът, който често се използва за поддържане на хемодинамиката при критично болни пациенти, е класически инхибитор на секрецията на ТРХ и ТСХ (35,36).

От всичко изброено става ясно, че наличието на ХОББ и провежданото лечение могат да нарушат тиреоидната хомеостаза по множество различни механизми. На *Фиг. 1* е представен опит за систематизиране на основните свързващи звена при този вид патология (22).

Как промените в тиреоидната ос повлияват протичането и прогнозата на ХОББ

Общи положения за съучастието на тиреоидните хормони в протичането на ХОББ

Интерпретацията на този въпрос е затруднена от факта, че в повечето случаи на отклонения в нивата на тиреоидните хормони при ХОББ всъщност се касае за NTIS. Сигурното му разграничаване от друга подлежаща тиреоидна патология не е възможно без допълнително изследване на fT_3, тиреоидни антитела и ехография на щитовидната жлеза. Изолираното понижение на ТСХ може да се интерпретира погрешно като субклиничен хипертиреоидизъм, а преходното му повишение във фазата на реконвалесценция – за хипотиреоидизъм. Реално почти няма проспективни проучвания за протичането на органична тиреоидна болест на фона на ХОББ. Затова и разсъжденията за влиянието на щитовидната жлеза върху белодробната болест и функция са извлечени от познанията в областта на физиологията/молекулярната биология, както и от промените в белодробната система при болни с доказан хипер- или хипотиреоидизъм.

Тиреоидните хормони имат различни геномни и негеномни въздействия (37,38). Като модел за тяхното проучване често е използван кардиомиоцитът. В *Табл. 1* по-долу са обобщени някои от геномните въздействия на тиреоидните хормони върху експресията на определени гени в кардиомиоцита (38).

Фигура 1. Връзка между ХОББ и тиреоидната дисфункция / патология – по (22)

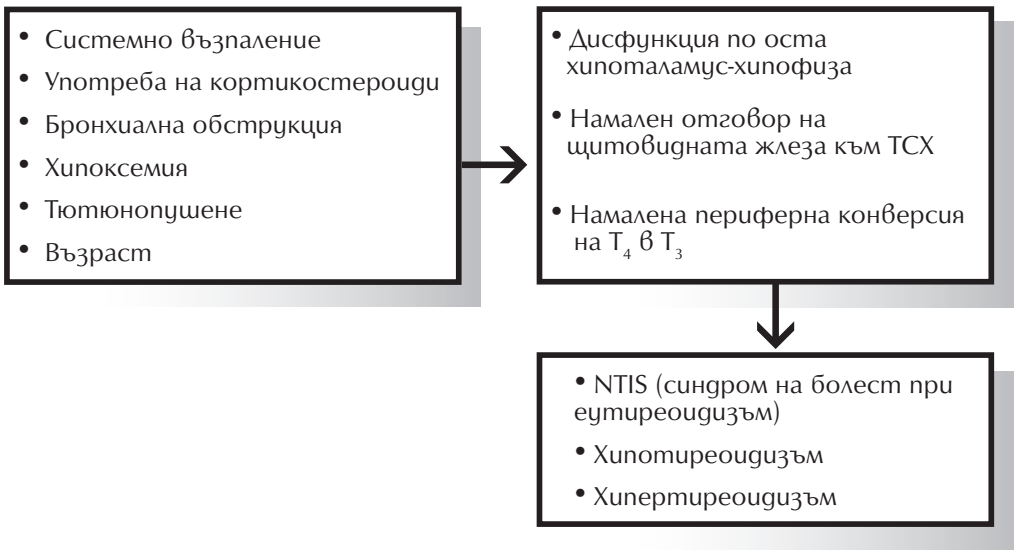


Таблица 1.

Ефекти на тиреоидните хормони върху експресията на гени в кардиомиоцитите – по (38)

Стимулират се (положителна регулация)	**Потискат се (отрицателна регулация)**
Тежка верига на α-миозина	Тежка верига на β-миозина
Калций-зависима АТФ-за в саркоплазматичния ретикулум	Фосфоламбан (инхибитор)
Na+/K+ АТФ-аза	Каталитични субединици на аденилатциклазите
β1-адренергичен рецептор	α1-рецептор за тиреоидните хормони
Предсърден натриуретичен хормон	Обменник на Na+/Ca2+
Волтажно-зависими калиеви канали (Kv1, Kv4, Kv4.3)	

Както се вижда от таблицата, тиреоидните хормони регулират редица гени, кодиращи миофибрилерни и калций-регулаторни протеини. Те усилват митохондриалните окислителни процеси и базалната обмяна. Към това се добавя и влиянието им върху метаболизма на протеините, липидите и въглехидратите, както и върху активността на множество мембранно-свързани ензими (39).

<u>Отражение на хипотиреоидизма върху протичането на ХОББ</u>

Подобно на общото население, и при пациентите с ХОББ хипотиреоидизмът се среща по-често от хипертиреоидизма. Забавянето на невро-мускулното предаване и понижената експресия на различни белтъци в миофибрите са в основата на наблюдаваната дисфункция на дихателната мускулатура. Силата, която развиват дихателните мускули при хипотиреоидизъм, е оценявана преди 30 години от N. Siafakas и сътр. (40). Те осъществяват спирометрия при 43 хипотиреоидни лица и допълнително оценяват максималните статични инспираторни и експираторни налягания. Те са корелирали линейно с нивата на ТСХ (отрицателна корелация) и T_3 (положителна корелация). Авторите провеждат и заместително лечение с тироксин и установяват повишение на статичните налягания в края на лечението. Така те доказват връзката между силата, която развиват дихателните мускули и степента на хипотиреоидизма (40). Към намалената мускулна сила се добавя и забавеното невромускулно провеждане, което е отдавна доказано и в случая касае и френичния нерв (41). Добре известна е и склонността към хиповентилация

Таблица 2.

Възможни взаимовръзки между изявения хипотиреоидизъм и протичането на ХОББ – по (22).

Клиничен проблем	Подлежащи механизми
Понижение на максималните инспираторни и експираторни дебити	Дисфункция на дихателните мускули Забавено невро-мсукулно провеждане Понижена експресия на миофибрилерни белтъци Невропатия на n. phrenicus
Алвеоларна хиповентилация	Потиснати дихателни рефлекси Слабост на дихателните мускули Плеврални изливи (холестеролови)
Обструктивна сънна апнея	Наднормено тегло / затлъстяване Отлагане на мукопротеини и полизахариди Потиснати дихателни рефлекси
Повишена честота на обостренията	Дисфункция на дихателните мускули Потиснати дихателни рефлекси Повишена склонност към инфекции

при изявен хипотиреоидизъм (42). Сред причините за намалената вентилация се обсъжда съчетание от периферни и централни механизми: обструктивна сънна апнея, наднормено тегло, отлагане на мукопротеини в съединителната тъкан (и лигавиците) и миопатия. Допълнително, хипотиреоидизмът се асоциира с понижена активност на окислителните процеси в митохондриите. Редица проучвания описват връзка между понижените нива на тиреоидните хормони и кръвно-газовите параметри. В проучването на C. Terzano и сътр. пациентите с изявен хипотиреоидизъм са имали по-ниски нива на pO2 и са показали тенденция за по-високи нива на pCO_2 (21). Наблюдавана е и положителна корелация между стойностите на TSH и честотата на екзацербациите, т.е. пациентите с хипотиреоидизъм имат по-висока честота на екзацербации (43).

В своя обзор по темата E. Akpinar предлага схематично няколко механизма, свързващи хипотиреоидизма с протичането на ХОББ (22).

Лечението на хипотиреоидизма при ХОББ следва обичайните насоки. Въпреки че някои негативни ефекти на хипотиреоидизма могат да бъдат повлияни от терапията, ефектът върху белодробната функция и прогнозата не е проучен. Не е изяснено дали заместителната терапия с левотироксин води до подобрение в клиничните показатели, но мускулната слабост, причинена от хипотиреоидизъм, е обратима след лечение (40). Следва да се имат предвид и възможностите за лекарствени взаимодействия на левотироксина с провежданата терапия (например с индиректни антикоагуланти, НСПВС, протонни инхибитори и много други). При пациенти, които приемат твърде много медикаменти или не могат да приемат левотироксин на гладно, следва да се обмисли приложение на течна форма на левотироксин, която не се влияе от часа на хранене и напълването на стомаха. Венозна форма за приложение на левотироксин у нас не е налична. Следва да се има предвид и въздействието на изразения хипотиреоидизъм върху метаболизма и фармакокинетиката на различните прилагани медикаменти, какъвто е класическият пример с променения ефект на теофилина (44).

<u>Отражение на хипертиреоидизма върху протичането на ХОББ</u>

Изявеният хипертиреоидизъм може да повлияе на модела на дишане, вероятно поради действието на тиреоидните хормони върху централните (повишен хипоксичен стимул) и периферните (хиперкапничен стимул) регулаторни механизми. При пациенти с ХОББ и хипертиреоидизъм може да се развие мускулна слабост в резултат на повишен катаболизъм. При пациенти с тиреотоксикоза се наблюдава загуба на мускулна маса и мускулна сила. Мускулната загуба може да е резултат и от недохранване, което е често срещано при пациенти с ХОББ. Диспнеята и хипервентилацията са чести при пациенти с хипертиреоидизъм и би трябвало да доведат до относително по-високи нива на pO_2 и по-ниски нива на pCO_2. Това обаче не се потвърждава изцяло в различните проучвания (45,46). G. Kahaly и сътр. изследват 42 пациенти с новооткрит хипер-

тиреоидизъм и отчитат ефекта на 7-дневно лечение с пропранолол, както и този от постигането на еутиреоидизъм 6 месеца по-късно (45). По време на хипертиреоидизма авторите регистрират неефективност на кардиопулмоналната функция (по-малко повишение на форсирания витален капацитет и кислородната дифузия при натоварване в близост до анаеробната граница), слабост на дихателната мускулатура и понижен общ физически капацитет. Те съобщават за значима корелация между fT_3 и стойностите на минутната вентилация и кислородните нива (45). В проучване от същия период при сравнение на 15 хипертиреоидни и 15 еутиреоидни лица се установява, че хипертиреоидните имат по-ниско парциално налягане на CO_2 и по-висок обем на инспираторния поток (46). При оценка на чувствителността към основните дихателни стимули се регистрира по-изразен отговор към хипоксемията и хиперкапнията при хипертиреоидните пациенти. Чувствителността на дихателния център към нивата на кислорода и въглеродния двуокис са корелирали с нивата на T_3 (46). Това наблюдение е неочаквано предвид тенденцията към хипервентилация и хипокапния при тиреотоксични пациенти без ХОББ и вероятно отразява алвеоларната хиповентилация при пациенти с ХОББ.

Рискът от дихателна недостатъчност изглежда е увеличен при пациенти с хипертиреоидизъм в резултат на слабост на дихателната мускулатура, намален белодробен къмплайнс и повишена чувствителност на периферните и централните хеморецептори. Лечението на хипертиреоидизма при пациенти с ХОББ следва стандартните препоръки. Обратно, хипертиреоидизмът следва да се има предвид при прилагане на други медикаменти поради повишената бета-адренергична активност и ускорен метаболизъм на медикаментите. Повишено внимание се изисква при приложение на йод-съдържащи вещества (контрастни вещества, амиодарон, съдържащи йодиди експекторанти и други). Следва да се отчита и възможността за развитие на парциален хипокортицизъм при тежките и продължителни епизоди на хипертиреоидизъм, особено по време на пролежаване в отделенията за интензивна дихателна реанимация.

Заключение

Тиреоидната дисфункция и NTIS често остават недиагностицирано съпътстващо заболяване при ХОББ. Те обаче имат важни клинични последици, които могат да повлияят негативно на хода и прогнозата на белодробното заболяване. Признаците и симптомите на органичничните заболявания на щитовидната жлеза могат да бъдат неспецифични, особено при възрастни хора, поради което диференциалната диагноза между симптомите на ХОББ и тези при заболяване на щитовидната жлеза може да предизвика затруднения. NTIS е най-често наблюдаваната тиреоидна констелация при пациенти с ХОББ, следван от хипотиреоидизъм. Затова при съмнение задължително се изследват едновременно ТСХ и fT_4, а при неясноти – и fT_3, плюс евентуално тиреоидни антитела (за откриване на лабораторни грешки и диференциална диагноза на NTIS). За оценка на морфологията на щитовидната жлеза освен палпацията е много полезно и ултразвуковото изследване. Присъствието на NTIS преставлява сложен ребус за клинициста – налице ли е „вътреклетъчен“ хипотиреоидизъм, трябва ли да се предприема някакво лечение. Необходими са широкомащабни и детайлни бъдещи проучвания за отговор на тези въпроси. Клиничната дисфункция на щитовидната жлеза е свързана с по-лоши клинични резултати при пациенти с ХОББ, като увеличаване честотата на екзацербациите и продължителна интубация. Натрупват се данни, че насоченото лечение на клиничните хипо- или хипертиреоидизъм повлиява благоприятно протичането и прогнозата на белодробната болест.

References

1. **Adeloye D, Agarwal D, Barnes PJ, Bonay M, van Boven JF, Bryant J, et al.** Research priorities to address the global burden of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in the next decade. *J Glob Health 2021;*11:15003. doi: 10.7189/jogh.11.15003.

2. **Hurst JR, Siddiqui MK, Singh B, Varghese P, Holmgren U, de Nigris E.** A Systematic Literature Review of the Humanistic Burden of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2021;*16:1303-1314.

3. **Valipour A, Aisanov Z, Avdeev S, Koblizek V, Kocan I, Kopitovic I, et al.** Recommendations for COPD management in Central and Eastern Europe. *Expert Rev Respir Med 2022*:1-13.

4. **Kamusheva M, Dimitrova M, van Boven JF, Postma MJ, van der Molen T, Kocks JW, et al.** Clinical characteristics, treatment patterns, and socio-economic burden of COPD in Bulgaria. *J Med Econ 2017;*20(5):503-509.

5. **Laghi F, Adiguzel N, Tobin MJ.** Endocrinological derangements in COPD. *Eur Respir J 2009;*34:975-996.

6. **Miłkowska-Dymanowska J, Białas AJ, Laskowska P, Górski P, Piotrowski WJ.** Thyroid gland in chronic obstructive pulmonary disease. *Adv Respir Med 2017;*85:28-34.

7. **DeGroot LJ.** The Non-Thyroidal Illness Syndrome. 2015 Feb 1. In: **Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al, editors.** Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): *MDText.com, Inc.;* 2000.

8. **Fliers E, Boelen A.** An update on non-thyroidal illness syndrome. *J Endocrinol Invest 2021;*44(8):1597-1607.

9. **Van den Berghe G.** Non-thyroidal illness in the ICU: a syndrome with different faces. *Thyroid 2014;*24(10):1456-1465.

10. **Sebasan RV, Baliga KV.** Prevalence of thyroid dysfunction in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease patients – a cross-sectional study. *Int J Scientif Study 2021;*9(5):160-165.

11. **Chaudhary SC, Ahmad T, Usman K, Sawlani KK, Gupta KK, Verma AK, Reddy DH.** Prevalence of thyroid dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease patients in a tertiary care center in North India. *J Family Med Prim Care 2018;*7(3):584-588.

12. **Okutan O, Kartaloglu Z, Onde ME, Bozkanat E, Kunter E.** Pulmonary function tests and thyroid hormone concentrations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Med Princ Pract 2004;*13(3):126–128.

13. **Gow SM, Seth J, Beckett GJ, Douglas G.** Thyroid function and endocrine abnormalities in elderly patients with severe chronic obstructive lung disease. *Thorax 1987;*42:520-525.

14. **Gumus A, Ozcelik N, Yilmaz Kara B, Ozyurt S, Sahin U.** Thyroid Gland Disease as a Comorbid Condition in COPD. *Pulm Med 2021;2021:*7479992. doi: 10.1155/2021/7479992.

15. **Dimopoulou I, Ilias I, Mastorakos G, Mantzos E, Roussos C, Koutras DA.** Effects of severity of chronic obstructive pulmonary disease on thyroid function. *Metab Clin Exp 2001;*50(12):1397–1401.

16. **Karadag F, Ozcan H, Karul AB, Yilmaz M, Cildag O.** Correlates of non-thyroidal illness syndrome in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med 2007;*101(7):1439–1446.

17. **Bacakoğlu F, Başoğlu OK, Gürgün A, Bayraktar F, Kiran B, Ozhan MH.** Can impairments of thyroid function test affect prognosis in patients with respiratory failure? *Tuberk Toraks 2007;*55(4):329-335.

18. **Huang D, Wu D, He J, Chen M, Zhao X, Li D, et al.** Association Between Thyroid Function and Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2021;*16:333-339.

19. **Gumus A, Ozyurt S, Ozcelik N, Kara BY.** Prevalence of non-thyroidal illness syndrome in COPD exacerbation and effect of hypoxaemia and hypercapnia on thyroid functions. *Clin Respir J 2020;*14(9):806-812.

20. **Yasar Z, Kirakli C, Cimen P, Zeren Ucar Z, Talay F, Tibet G.** Is non-thyroidal illness syndrome a predictor for prolonged weaning in intubated chronic obstructive pulmonary disease patients? *Int J Clin Exp Med 2015;*8(6):10114–10121.

21. **Terzano C, Romani S, Paone G, Conti V, Oriolo F.** COPD and thyroid dysfunctions. *Lung 2014;*192(1):103–109.

22. **Akpınar EE.** An underestimated comorbidity of COPD: Thyroid dysfunction. *Tuberk Toraks 2019 Jun;*67(2):131-135.

23. **Wouters EF.** Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc 2005;*2:26–33.

24. **Tang KT, Braverman LE, DeVito WJ.** Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma modulate gene expression of type I 5'-deiodinase, thyroid peroxidase, and thyroglobulin in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinology 1995;*136(3):881-888.

25. **Kamath J, Yarbrough GG, Prange AJ Jr, Winokur A.** The thyrotropin-releasing hormone (TRH)-immune system homeostatic hypothesis. *Pharmacol Ther 2009;*121(1):20-28.

26. **Stouthard JM, van der Poll T, Endert E, Bakker PJ, Veenhof CH, Sauerwein HP, et al.** Effects of acute and chronic interleukin-6 administration on thyroid hormone metabolism in humans. *J Clin Endocrinol Metab 1994;*79(5):1342–1346.

27. **McCusker K.** Mechanisms of respiratory tissue injury from cigarette smoking. *Am J Med 1992;*93(1A):18S–21S.

28. **Meral I, Arslan A, Him A, Arslan H.** Smoking-related Alterations in Serum Levels of Thyroid Hormones and Insulin in Female and Male Students. *Altern Ther Health Med 2015;*21(5):24–29.

29. **Mancini A, Corbo GM, Gaballo A, Valente S, Gigliotti P, Cimino V, et al.** Relationships between plasma CoQ10 levels and thyroid hormones in chronic obstructive pulmonary disease. *Biofactors 2005;*25(1-4):201-204.

30. **Suzuki Y, Nanno M, Gemma R, Yoshimi T.** Plasma free fatty acids, inhibitor of extrathyroidal conversion of T4 to T3 and thyroid hormone binding inhibitor in patients with various nonthyroidal illnesses. *Endocrinol Jpn 1992;*39(5):445-453.

31. **Gałecka E, Kumor-Kisielewska A, Górski P.** Assessment of serum levels of DIO1 and DIO3 in patients diagnosed with COPD. *Adv Med Sci 2019;*64(2):344-348.

32. **Boelen A, Boorsma J, Kwakkel J, Wieland CW, Renckens R, Visser TJ, et al.** Type 3 deiodinase is highly expressed in infiltrating neutrophilic granulocytes in response to acute bacterial infection. *Thyroid 2008;*18(10):1095-1103.

33. **Maes M, Vandewoude M, Schotte C, Martin M, Blockx P.** Suppressive effects of dexamethasone on hypothalamic-pitui tary-thyroid axis function in depressed patients. *J Affect Disord 1990;*20(1):55-61.

34. **Hu Y, Man Y, Sun X, Xue Y.** Effects of glucocorticoid pulse therapy on thyroid function and thyroid antibodies in children with graves' disease. *Ital J Pediatr 2021;*47(1):46.

35. **Kaptein EM, Spencer CA, Kamiel MB, Nicoloff JT.** Prolonged dopamine administration and thyroid hormone economy in normal and critically ill subjects. *J Clin Endocrinol Metab 1980;*51(2):387-393.

36. **Van den Berghe G, de Zegher F.** Anterior pituitary function during critical illness and dopamine treatment. *Crit Care Med 1996;*24(9):1580-1590.

37. **Bassett JH, Harvey CB, Williams GR.** Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol 2003;*213(1):1-11.

38. **Klein I, Danzi S.** Thyroid disease and the heart. *Circulation 2007;*116(15):1725-1735.

39. **Lozanov BS, Lozanov LB.** Diseases of the thyroid gland. Ed. Simolini 94, Sofia 2018, pp. 25-32. (In Bulgarian) **[Лозанов БС, Лозанов ЛБ.** Болести на щитовидната жлеза. *Изд. Симолини 94, София 2018,* стр. 25-32.]

40. **Siafakas NM, Salesiotou V, Filaditaki V, Tzanakis**

N, Thalassinos N, Bouros D. Respiratory muscle strength in hypothyroidism. *Chest 1992;*102(1):189-194.

41. **Duyff RF, Van den Bosch J, Laman DM, van Loon BJ, Linssen WH.** Neuromuscular findings in thyroid dysfunction: a prospective clinical and electrodiagnostic study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry 2000;*68(6):750-755.

42. **Jha A, Sharma SK, Tandon N, Lakshmy R, Kadhiravan T, Handa KK, et al.** Thyroxine replacement therapy reverses sleep-disordered breathing in patients with primary hypothyroidism. *Sleep Med 2006;7*(1):55-61.

43. **Sarinc Ulasli S, Bozbas SS, Ozen ZE, Ozyurek BA, Ulubay G.** Effect of thyroid function on COPD exacerbation frequency: a preliminary study. *Multidiscip Respir Med 2013;*8(1):64.

44. **Pokrajac M, Simić D, Varagić VM.** Pharmacokinetics of theophylline in hyperthyroid and hypothyroid patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Clin Pharmacol 1987;*33(5):483-486.

45. **Kahaly GJ, Nieswandt J, Wagner S, Schlegel J, Mohr-Kahaly S, Hommel G.** Ineffective cardiorespiratory function in hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab 1998;*83(11):4075-4078.

46. **Pino-García JM, García-Río F, Díez JJ, Gómez-Mendieta MA, Racionero MA, Díaz-Lobato S, Villamor J.** Regulation of breathing in hyperthyroidism: relationship to hormonal and metabolic changes. *Eur Respir J 1998;*12(2):400-407.

Address for correspondence:

Доц. д-р Евгени Мeков, дм
УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ ЕАД
Бул. „Акад. Иван Гешов“ 15 гр. София
e-mail: evgeni.mekov@gmail.com

Assoc. Prof. Evgeni Mekov, PhD
University Hospital „Sv. Ivan Rilski“
15, „Acad. Ivan Geshov“ blvd.
Sofia; e-mail: evgeni.mekov@gmail.com

Оценка на нивата на прооксидативни и антиоксидантни маркери в експериментални животински модели с различни диетични режими

Строкова-Стоилова, Маргарита В.[1], Попова, Даниела В.[2], Пешев, Райко Д.[3], Андреева-Гатева, Павлина А[1]

[1] Катедра по Фармакология и Токсикология, Медицински университет, София
[2] Клиника по ендокринология и болести на обмяната за лечение на метаболитни нарушения, УМБАЛ „Царица Йоанна“, София
[3] НРЛ ТСЕ към НДНИВМИ

Адрес за кореспонденция:
Павлина Андреева-Гатева
Катедра по Фармакология и Токсикология,
Медицински факултет, Медицински университет, София,
ул. Здраве 2, София 1431
e-mail: pandreeva_gateva@outlook.com

Постъпване: 08. 05. 2022
Приемане: 25. 05. 2022

Резюме

Оксидативният стрес е ключов фактор за здравето и патогенезата на редица обменни заболявания. Той настъпва, когато производството на реактивни кислородни видове (ROS) надвишава ендогенната антиоксидантна активност. Кетогенната диета - нисковъглехидратна диета богата на мазнини, може да повлиява оксидативния стрес, въздействайки на митохондриалното количество и/или качество и вероятно да спомага за удължаване на живота. Суплементирането с витамин D може да намали нивата на чернодробен оксидативен стрес и да подобри възпалението чрез намаляване на липидната пероксидация и производството на цитокини.

Целта на настоящето проучване е да оценим нивата на Глутатион пероксидаза като антиоксидантен маркер и 8-OHdG като прооксидантен маркер при опитни животни, подложени на кетодиета, суплементирани с Витамин D, приемащи кетодиета и витамин D едновременно и контролна група на стандартна диета.

Методи: 40 броя опитни животни (мъжки мишки) бяха разделени на четири групи (n=10 във всяка група) и бяха подложени на различни хранителни режими и суплементиране за 30 дни.

Резултати: Най-високи нива на антиоксидантния маркер глутатион пероксидаза и най-ниските нива на прооксидантния маркер (8-OHDG) са наблюдавани в групата с кетодиета + витамин D, показвайки най-високата антиоксидантна сила на тази комбинация. Само Витамин D и само кетодиетата показват по-високи нива на глутатион пероксидаза и по-ниски нива на 8-OHDG в сравнение с контролната група.

Необходими са допълнителни проучвания, които изследват задълбочено влиянието на различни хранителни режими и суплементирането на витамини за оптимално повлияване на оксидативния стрес и клетъчното стареене.

Ключови думи: оксидативен стрес, кетогенна диета, витамин D

Въведение

Оксидативният стрес е ключов фактор за здравето и патогенезата на редица обменни заболявания. Неговото особено участие в развитието на затлъстяване, захарен диабет тип 2, сърдечно-съдови нарушения, невродегенеративни и други заболявания привличат голямо внимание на научната общност през последните години (1, 2).

В здравите аероби производството на свободни радикали е приблизително балансирано от антиоксидантни защитни системи. Оксидати-

вен стрес настъпва, когато производството на реактивни кислородни видове (ROS) надвишава ендогенната антиоксидантна активност (3-5). Потенциалните щети са наречени „окислително увреждане".

Различните хранителни и двигателни режими оказват въздействие върху гореописаните показатели. Проучвания показват, че кетогенна диета – нисковъглехидратна диета богата на мазнини, може да повлиява оксидативния стрес, въздействайки на митохондриалното количество и/или качество и вероятно да спомага за удължаване на живота (6, 7). Кетогенната диета предизвиква начално покачване на продукцията на ROS, които могат да играят роля на редокс-сигнализация, активирайки детоксикационните механизми на клетката. Три седмици след началото на диетата се наблюдава обратният ефект (8).

Освен в скелетната минерализация, понастоящем е известно, че Витамин D участва в проапоптотични, антиангиогенни, антипролиферативни, продиференциращи, антиинвазивни и антиметастатични биологични процеси (9, 10). Освен това има и нови доказателства, че витамин D може да има антиоксидантни и противовъзпалителни функции (11). Суплементирането с витамин D може да намали нивата на чернодробен оксидативен стрес и да подобри възпалението чрез намаляване на липидната пероксидация и производството на цитокини (10, 12).

Глутатион пероксидазата (GPx) е селенсъдържащ антиоксидантен ензим, който ефективно намалява H_2O_2 и липидните пероксиди съответно до вода и липидни алкохоли и от своя страна окислява глутатиона до глутатион дисулфид. Намаленият глутатион играе основна роля в регулирането на вътреклетъчното окислително-възстановително състояние на съдовите клетки, като осигурява редуциращи еквиваленти за много биохимични пътища (13). *8-хидрокси-дезоксигуанозин (8-Hydroxy-desoxyguanosine,8-OHdG)* е биомаркер, който се използва за оценка на увреждането на ДНК при хора след излагане на канцерогенно влияние, като тютюнев дим, азбестови влакна, тежки метали и полициклични ароматни въглеводороди (14). През последните години 8-OHdG се използва широко в много проучвания не само като биомаркер за измерване на ендогенно оксидативно увреждане на ДНК.

Във връзка с посочените данни си поставихме за цел да оценим нивата на Глутатион пероксидаза като антиоксидантен маркер и 8-OHdG като прооксидантен маркер при опитни живот ни (мишки), подложени на кетодиета, суплементирани с Витамин D, приемащи кетодиета и витамин D едновременно и контролна група на стандартна диета.

Материали и методи

40 броя опитни животни (мъжки мишки) бяха разделени на четири групи (n=10 във всяка група) и бяха подложени на различни хранителни режими и суплементиране за 30 дни:

Група 1 (n=10) – кетодиета (KetoCAL 4:1 at libitum)

Група 2 – кетодиета + витамин D (KetoCAL 4:1 at libitum + 1 капка 500 UI Vigantol per os дневно)

Група 3 – витамин D (1 капка 500 UI Vigantol per os дневно)

Група 4 – контролна група на стандартна диета at libitum

Теглото на опитните животни беше измервано веднъж седмично. Животните бяха отглеждани в стандартни лабораторни условия. Експериментът се проведе през месец ноември 2021 г.. За провеждане на опита беше получено разрешение от Българската агенция по безопасност на храните N 316/15.10.2021.

След 30 дневно третиране, мишките бяха сакрифицирани според приетите етични стандарти и бяха взети кръвни проби.

Нивата на глутатион пероксидаза в кръвния серум бяха изследвани като анти-оксидантен маркер. Беше използван Mouse Glutathione Peroxidase (GSH-PX) Quantitative sandwich ELISA kit. Серумните нива на глутатион пероксидаза бяха изчислени чрез изготвяне на стандартна крива. Нивата на 8-хидрокси-дезоксигуанозин (8-OHDG) бяха изследвани като про-оксидантен маркер. Беше използван Mouse 8-OHDG competitive ELISA kit. Серумните нива на 8-OHDG бяха изчислени чрез изготвяне на стандартна крива.

Резултати

Опитните животни понасяха добре всички хранителни режими. Не наблюдавахме значителни разлики в наддаването на тегло между изследваните групи. Динамиката на средното тегло е показана в *Таблица 1.*

Глутатион пероксидаза

Средните серумни нива на глутатион пероксидаза са представени на *Фигура 1.*

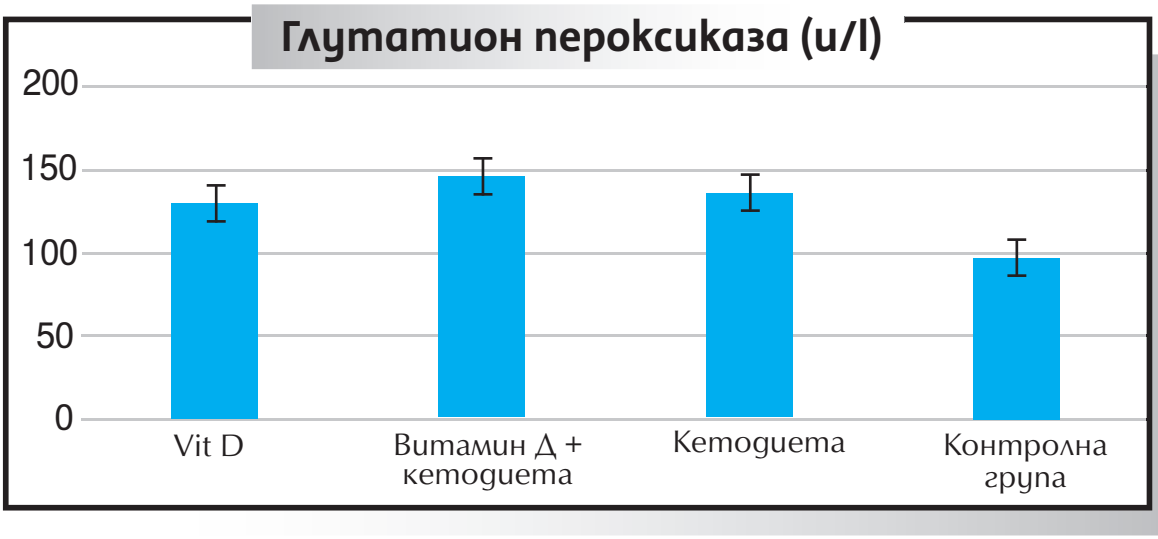
Най-високи нива на глутатион пероксидаза се наблюдаваха в групата на кетодиета + витамин D (146,65 u/l), а най-ниски – в контролната група (97,54 u/l). Серумните нива на глутатион пероксидаза в групата с витамин D (130,95 u/l) са по-високи от тези в контролната група и малко по-ниски от тези в групата с кетодиета (136,76 u/l).

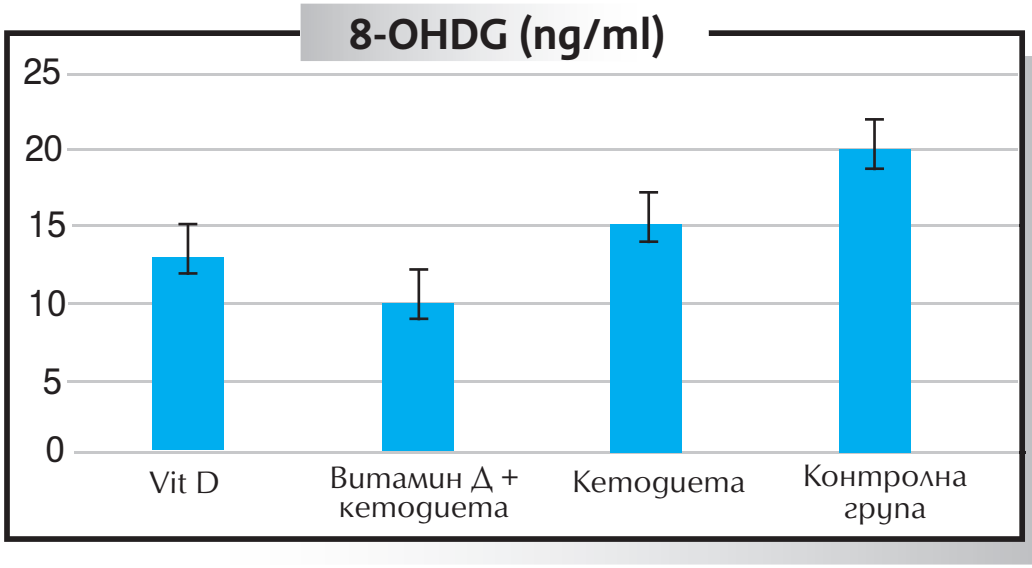
8 Хидрокси 2 дезоксигуанозин (8-OHDG)

Таблица 1. Средно тегло при различните групи изследвани опитни животни.

Група	Средно начално тегло (г)	Средно тегло седмица (г)	Средно тегло 2 седмица (г)	Средно тегло 3 седмица (г)	Средно тегло 4 седмица (г)	Общо нарастване (%)
Витамин D	19,75	22	23	24	27	37%
Витамин D+ Кетодиета	20,5	24	25	27	28	37%
Кетодиета	19,5	22,5	24	26	27	38%
Контролна група	19,1	21,5	23	24	26	36%

Фигура 1 .
Средни серумни нива на глутатион пероксидаза.





Фигура 2 .
Средни серумни нива на 8-OHDG.

Средните серумни нива на 8-OHDG са представени на *Фигура 2*.

Най-високи серумни нива на 8-OHDG са наблюдавани в контролната група (19,99 ng/ml), последвана от групата на кетодиета (15,06 ng/ml) и тази на Витамин D (12,93 ng/ml). Най-ниските стойности на 8-OHDG са наблюдавани в групата с Витамин D + кетодиета (10,02 ng/ml)

Обсъждане

В настоящето проучване анализирахме нивата на про-оксидантни и антиоксидантни маркери при опитни животни, подложени на различни хранителни режими – кетогенна диета, кетогенна диета с добавяне на витамин D, само прием на витамин D и контролна група на стандартна диета.

Множество научни изследвания намират връзка между прилагането на кетогенна диета и стимулирнето на редица антиоксидантни и противовъзпалителни механизми (7,16,17). Положителното влияние на кетонните тела се развива с течение на времето. Първоначално е наблюдавано повишение на ROS и медиаторите на възпалението, последвано от адаптивен клетъчен защитен отговор. Това води до положителна регулация на защитните клетъчни механизми, а то от своя страна – до повишена антиоксидантна и противовъзпалителна активност и възстановяване на клетките (14). Смята се, че кетогенната диета проявява своите положителни ефекти чрез стимулиране на митохондриалната функция (17).Тези данн и се потвърждават от получените от нас резултати, показващи повишаване на антиоксидантната защита при опитни животни подложени на кетодиета в продължение на 30 дни.

Витамин D участва в редица клетъчни про-цеси, свързани с глюкозната и липидната обмяна и има противовъзпалителни, антиоксидантни и невропротективни свойства (9,10). Недостатъчност на витамин D е свързана с ефектите на оксидативен стрес и възпалението и по този начин с намалена протекция при състояния като захарен диабет и чернодробна исхемия (11,17). Суплементирането с витамин D може да редуцира нивата на чернодробния оксидативен стрес и да намали липидната пероксидация и производството на цитокини.

В научната литература няма категорични данни за влиянието на комбинация от кетодиета и суплементиране с витамин D върху нивата на оксидативен стрес. След перорален прием, витамин D (витамин D_2 или D_3) обикновено се абсорбира в тънките черва с други хранителни мазнини (18-20). Наличието на мазнини в лумена предизвиква освобождаане на жлъчни киселини, които предизвикват емулгирането и подпомагат образуването на съдържащи липиди мицели (12, 21). Богатата на мазнини кетодиета е възможно на повлиява благоприятно усвояването на витамин D и по този начин да подпомага и неговите антиоксидантни ефекти.

Заключение

Оксидативният стрес се дължи на повишено образуване на реактивни кислородни видове (ROS) или на намален антиоксидантен капацитет (4, 8, 14). Това са химически реактивни съединения, които се произвеждат в резултат от нормалния аеробен клетъчен метаболизъм и са необходими за важни имунологични реакции, клетъчния растеж и диференциация, но произведени в прекомерни количества, могат да бъдат вредни (19,20).

Кетогенната диета намира широко приложение в управлението на редица медицински състояния. През последните години се натрупват все повече доказателства за стимулиращото влияние на кетогенната диета върху митохондриалната биогенеза, подобряване на митохондриалната функция и намаляване на оксидативния стрес (22, 23).

Антиоксидантните и противовъзпалителни ефекти на Витамин D се наблюдават в редица проучвания (9,10).

В научната литература няма убедителни данни за влиянието на комбинирането на кетогенна диета и суплементиране с витамин D върху нивата на оксидативен стрес. Настоящето проучване показва по-голяма антиоксидантна активност на тази комбинация, сравнено с отделното приложние на кетодиета или добавяне на витамин D.

Данните от нашето проучване са консистентни по отношение на про-оксидантните и антиоксидантните маркери. Най-високи нива на антиоксидантния маркер глутатион пероксидаза и най-ниските нива на прооксидантния маркер (8-OHdG) са наблюдавани в групата с кетодиета + витамин D, показвайки най-високата антиоксидантна сила на тази комбинация. Само Витамин D и само кетодиетата показват по-високи нива на глутатион пероксидаза и по-ниски нива на 8-OHDG в сравнение с контролната група.

Необходими са допълнителни проучвания, които изследват задълбочено влиянието на различни хранителни режими и суплементирането с витамини за оптимално повлияване на оксидативния стрес и клетъчното стареене.

Благодарности: Настоящето проучване е извършено с финансовата подкрепа на конкурс „Млад изследовател 2021“ на МУ, София, договор № Д—130/2021

Assessment of the Levels of Pro-oxidative and Anti-oxidative Markers in Experimental Animal Models with Different Dietetic Regimens

Strokova-Stoilova, Margarita V.[1], Popova, Daniela V.[2], Peshev, Raiko D.[3], Andreeva-Gateva, Pavlina A.[1]

[1.] Department of Pharmacology and Toxicology, Medical University of Sofia
[2.]Clinic of Metabolic – endocrine diseases and dietetics, University Hospital Tzaritsa Joanna, Sofia
[3.]National diagnostic and research veterinary medical institute, „Prof. G. Pavlov", Sofia

Address for correspondence:
Pavlina Andreeva-Gateva, MD, PhD
Department of Pharmacology and Toxicology,
Medical Faculty, Medical University of Sofia,
2, Zdrave Str., 1431 Sofia
e-mail: pandreeva_gateva@outlook.com

Submitted: 08. 05. 2022
Accepted: 25. 05. 2022

Abstract

Oxidative stress is a key factor in health and the pathogenesis of several metabolic diseases. It occurs when the production of reactive oxygen species (ROS) exceeds endogenous antioxidant activity. A ketogenic, low-carbohydrate, high-fat diet can affect mitochondrial quantity and /or quality, this reducing oxidative stress and possibly helping to prolong life. Vitamin D supplementation can reduce the levels of hepatic oxidative stress and improve inflammation by reducing lipid peroxidation and cytokine production.

The aim of our study was to evaluate the levels of Glutathione peroxidase as an antioxidant marker and 8-OHdG as a prooxidant marker in experimental animals that are supplemented with vitamin D alone, receiving ketogenic diet alone, keto-diet + vitamin D and a standard control group.

Methods: 40 experimental animals (male mice) were divided into 4 groups (n-10 in each group) and subjected to different diets and supplementation for 30 days.

Results: The highest levels of the antioxidant marker Glutathione peroxidase and the lowest levels of the prooxidant marker (8-OHdG) were observed in the keto-diet + vitamin D group, showing the highest antioxidant power of this combination. Vitamin D alone and keto-diet alone showed higher levels of glutathione peroxidase and lower levels of 8-OHdG, compared to the control group.

Further studies are needed to thoroughly investigate the effects of different diets and vitamin supplements to optimally influence oxidative stress and cellular aging.

Key words: oxidative stress, ketogenic diet, vitamin D

Introduction

Oxidative stress is a key factor in health and the pathogenesis of several metabolic diseases. Its' involvement in the development of obesity, type 2 diabetes, cardiovascular disorders, neurodegenerative and other diseases has attracted the attention of scientific research in recent years (1, 2). In healthy aerobes, the production of reactive oxygen species (ROS) is balanced by antioxidant defence systems. Oxidative stress occurs when their production exceeds endogenous antioxidant activity (3,4,5). Potential cell damage is called „oxidative damage".

Different diets and exercise regimens have an impact on the above indicators. Studies show that a ketogenic, low carbohydrate, high fat diet can influence oxidative stress levels by affecting the mitochondrial quantity and / or quality and possibly helping to

prolong life (6, 7). The ketogenic diet causes an initial increase in ROS production, which can play a role in redox signaling, activating detoxification cellular mechanisms. The opposite effect is observed approximately three weeks after the start of the diet (8).

In addition to skeletal mineralization, it is now known that Vitamin D is involved in pro-apoptotic, antiangiogenic, antiproliferative, antiinvasive and antimetastatic biological processes (9, 10). There is also new evidence that vitamin D may have antioxidant and anti-inflammatory functions (11). Vitamin D supplementation can reduce the levels of hepatic oxidative stress and improve inflammation by reducing lipid peroxidation and cytokine production (10, 12).

Glutathione peroxidase (GPx) is a selenium containing antioxidant enzyme that effectively reduces H2o2 and lipid peroxides to water and lipid alcohols, respectively, and reduces glutathione to glutathione disulfide. Reduced glutathione plays a key role in regulating the intracellular redox state of vascular cells, providing reducing equivalents for many biochemical pathways (13). 8-Hydroxy-desoxyguanosine (8-OHdG) is a biomarker used to assess DNA damage in humans after exposure to carcinogens such as tobacco smoke, asbestos fibers, metals and polycyclic aromatic carbohydrates (14). In recent years 8-OHdG has been widely used in many studies as a biomarker to measure endogenous oxidative DNA damage.

In connection with these data, we *aimed* to assess the levels of Glutathione peroxidase as an antioxidant marker and 8-OHdG as prooxidant marker in experimental animals (mice) receiving keto diet and Vitamin D supplementation, receiving keto diet alone, vitamin D alone and control group on a standard diet.

Materials and methods

Forty laboratory mice were divided in four groups (n=10 in each group) and exposed to different diet and supplementation regimens for 30 days:

- Group 1 – low fat ketogenic diet (KetoCAL 4:1 at libitum)
- Group 2 – low fat ketogenic diet + supplementation of vitamin D (KetoCAL 4:1 at libitum + 1 drop 500 UI Vigantol per os daily)
- Group 3 – standard feed + supplementation of vitamin D (1 drop 500 UI Vigantol per os daily)
- Group 4 – standard feed – control group on standard laboratory food at libitum

Body weight was measured weekly.

The animals were kept in standard laboratory conditions. The experiment was conducted in November 2021. Permission was obtained from the Bulgarian Food Safety Agency N 316 / 15.10.2021.

After 30 days under the described diet and supplementation, the mice were euthanized according to accepted ethical standards and blood samples were taken.

Blood serum levels of Glutathione Peroxidase were studied to determine anti-oxidative levels. Mouse Glutathione Peroxidase (GSH-PX) Quantitative sandwich ELISA kit was used. Serum levels of glutathione peroxidase were then calculated using standard curve preparation.

Blood serum levels of 8 Hydroxy 2 Desoxyguanosine (8-OHdG) were studied to determine pro-oxidative levels. Mouse 8-OHdG competitive ELISA kits were used, and serum levels were calculated using standard curve preparation.

Results

All diets were well tolerated. We did not observe significant differences in body weight gain between study groups. The average weight dynamics are shown in the *Table 1.*

Glutathione peroxidase

Average serum levels of Glutathione peroxidase are presented on *Figure 1*.

The highest levels of Glutathione peroxidase were observed in the Vitamin D +Keto diet group and the lowest levels were observed in the control group. The Serum levels of Glutathione peroxidase in the Vitamin D group were higher than the ones in the control group and slightly lower than ones in the Keto diet group.

8 Hydroxy 2 Desoxyguanosine (8-OHdG)

Average serum levels of 8-OHdG are presented in *Figure 2.*

The highest blood serum levels of 8-OHdG were observed in the control group (19,99 ng/ml), followed by the keto group (15,06 ng/ml) and the Vitamin D group (12,93 ng/ml). The lowest values of 8-OHDG were observed in the Vitamin D + Keto diet group (10,02 ng/ml)

Discussions

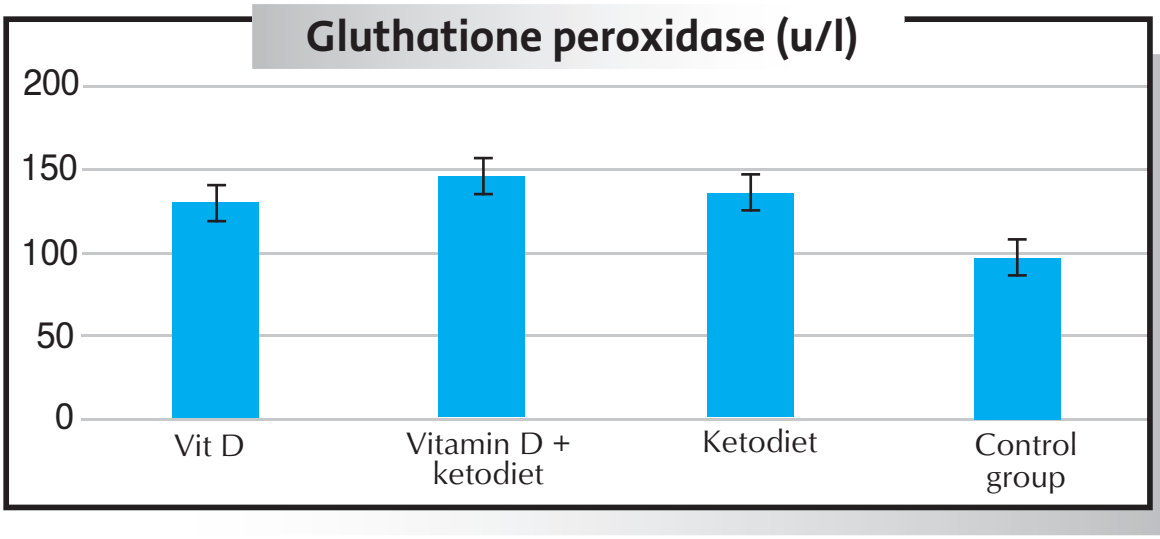
In the present study, we analyzed the levels of prooxidant and antioxidant markers in experimental animals subjected to different diets – ketogenic diet, ketogenic diet with added vitamin D, vitamin D alone and control group on standard diet.

Numerous studies have linked the ketogenic diet to the stimulation of several antioxidant and anti-inflammatory mechanisms (7,16,17). The positive effects of ketone bodies develop over time. An increase in ROS

Table 1. Average weight in the different study groups

Group	Average initial weight (g)	Average weight 1 week (g)	Average weight 2 weeks (g)	Average weight 3 weeks (g)	Average weight 4 weeks (g)	Total increase (%)
Vitamin D	19,75	22	23	24	27	37%
Vitamin D + Keto diet	20,5	24	25	27	28	37%
Keto diet	19,5	22,5	24	26	27	38%
Control	19,1	21,5	23	24	26	36%

Figure 1 .
Average serum levels of Glutathione peroxidase



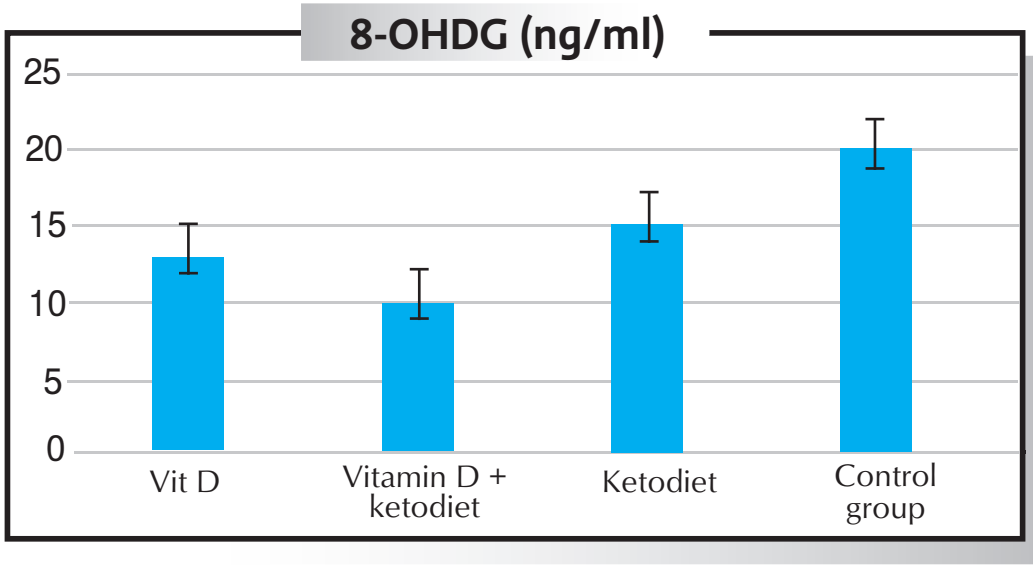


Figure 2 .
Average serum levels of 8-OHdG

and inflammatory mediators was initially observed, followed by an adaptive cellular defence response. This leads to positive regulation of cellular defence mechanisms, which in turn leads to increased antioxidant and anti-inflammatory activity and cell repair (14). It is considered that the ketogenic diet is providing its positive effects by stimulating mitochondrial function (17).

These data are confirmed by the results of our study, showing an increase in antioxidant protection in experimental animals subjected to the keto diet for 30 days.

Vitamin D is involved in several cellular processes related to glucose and lipid metabolism and has anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotective properties (9,10). Vitamin D deficiency is associated with the effects of oxidative stress and inflammation and thus reduced protection in conditions such as diabetes and hepatic ischemia (11,17). Vitamin D supplementation can reduce levels of hepatic oxidative stress and reduce lipid peroxidation and cytokine production.

There is no conclusive data in the scientific literature on the effect of a combination of keto diet and vitamin D supplementation on oxidative stress levels.

After oral administration, vitamin D (vitamin D2 or D3) is usually absorbed in the small intestine with other dietary fats. (18,19,20). The presence of fat in the lumen stimulates the release of bile acids, which cause emulsification and promote the formation of lipid-containing micelles (12,21). The high-fat ketodiet may have a beneficial effect on the absorption of vitamin D and thus support its antioxidant effects.

Conclusion

Oxidative stress is caused by increased formation of reactive oxygen species (ROS) or reduced antioxidant capacity (4,8,14). ROS are chemically reactive compounds produced as a result of normal aerobic cellular metabolism and are required for important immunological responses, cell growth and differentiation, but when produced in excessive amounts they can be harmful (19,20).

The ketogenic diet is widely used in the management of a number of medical conditions. In recent years, there is growing evidence of the stimulating effect of ketogenic diet on mitochondrial biogenesis, improving mitochondrial function and reducing oxidative stress (22,23). The antioxidant and anti-inflammatory effects of Vitamin D have also been observed in a number of studies (9,10).

There are no explicit data available in the scientific literature on the effect of combining a ketogenic diet and vitamin D supplementation on oxidative stress levels. The present study shows greater antioxidant activity of this combination compared to a single ketodiet or vitamin D supplementation. Our data are consistent in measuring levels of prooxidant and antioxidant markers.

The highest levels of the antioxidant marker glutathione peroxidase and the lowest levels of the prooxidant marker (8-OHDG) were observed in the ketodiet + vitamin D group, showing the highest antioxidant power of this combination. Vitamin D supplementation alone and the ketodiet alone showed higher levels of glutathione peroxidase and lower levels of 8-OHdG compared to the control group.

Further studies are needed to thoroughly investigate the effects of different diets and vitamin supplements to optimally respond to oxidative stress and cellular aging

Acknowledgement: This study was supported by „Young Researcher 2021“ of Medical University of Sofia, Contract № D-130/2021

References

1. **Găman MA, Epîngeac ME, Diaconu CC, Găman AM.** Evaluation of oxidative stress levels in obesity and diabetes by the free oxygen radical test and free oxygen radical defence assays and correlations with anthropometric and laboratory parameters. *World J Diabetes 2020;* 11(5): 193-201.

2. **Niemann B, Rohrbach S, Miller MR, Newby DE, Fuster V, Kovacic JC.** Oxidative Stress and cardiovascular Risk: Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution: Part 3 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol 2017;* 70(2): 230-251.

3. **Nawab A, Nichols A, Klug R, Shapiro JI, Sodhi K.** Spin Trapping: A Review for the Study of Obesity Related Oxidative Stress and Na/K-ATPase. *J Clin Cell Immunol 2017;* 8(3): 505.

4. **Lechuga-Sancho AM, Gallego-Anduja r D, Ruiz-Ocaña P, Visiedo FM, Saez-Benito A, Schwarz M, et al.** Obesity induced alterations in redox homeostasis and oxidative stress are present from an early age. *PLoS One 2018;* 13(1): e0191547.

5. **Na IJ, Park JS, Park SB.** Association between Abdominal Obesity and Oxidative Stress in Korean Adults. *Korean J Fam Med 2019;* 40(6): 395-398.

6. **Milder J, Liang L, Patel M.** Acute Oxidative Stress and Systemic Nrf2 Activation by the Ketogenic Diet. *Neurobiol Dis 2010;* 40(1): 238–244.

7. **Puchalska P, Crawford PA.** Multi-dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics. *Cell Metab 2017;* 25:262

8. **Kolb H, Kempf K, Röhling M, Lenzen-Schulte M, Schloot NC, Martin S.** Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. *BMC Med 2021;* 19(1): 313.

References

9. **Dzik KP, Kaczor JJ.** Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. *Eur J Appl Physiol 2019;* 119(4): 825-839.

10. **Cui C, Xu P, Li G, Qiao Y, Han W, Geng C, et al.** Vitamin D receptor activation regulates microglia polarization and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats and angiotensin II-exposed microglial cells: Role of renin-angiotensin system *Redox Biology, 2019; 26:* 101295, ISSN 2213-2317.

11. **Chang SW, Lee HC.** Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. *Pediatr Neonatol 2019;* 60(3) :237-244.

12. **Adelani IB, Ogadi EO, Onuzulu C, Rotimi OA, Maduagwu EN, Rotimi SO.** Dietary vitamin D ameliorates hepatic oxidative stress and inflammatory effects of diethylnitrosamine in rats. *Heliyon 2020;* 6(9): e04842.

13. **Kephart WC, Mumford PW, Mao X, Romero MA, Hyatt HW, Zhang Y, et al.** The 1-Week and 8-Month Effects of a Ketogenic Diet or Ketone Salt Supplementation on Multi-Organ Markers of Oxidative Stress and Mitochondrial Function in Rats. *Nutrients 2017;* 9(9): 1019.

14. **Guo C, Li X, Wang R, Yu J, Ye M, Mao L, Zhang S, Zheng S.** Association between Oxidative DNA Damage and Risk of Colorectal Cancer: Sensitive Determination of Urinary 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine by UPLC-MS/MS Analysis. *Sci Rep 2016;* 6: 32581.

15. **Veech RL, Bradshaw PC, Clarke K, Curtis W, Pawlosky R, King MT.** Ketone bodies mimic the life span extending properties of caloric restriction. *IUBMB Life 2017;* 69: 305.

16. **Han YM, Ramprasath T, Zou MH.** β-Hydroxybutyrate and its metabolic effects on age-associated pathology. *Exp Mol Med 2020;* 52: 548.

17. **Zweers H, van Wegberg AMJ, Janssen MCH, Wortmann SB.** Ketogenic diet for mitochondrial disease: a systematic review on efficacy and safety. *Orphanet J Rare Dis 2021;* 16(1): 295. Erratum in: Orphanet J Rare Dis 2021; 16(1):397.

18. **Gil Á, Plaza-Diaz J, Mesa MD.** Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab 2018;* 72(2): 87-95.

19. **Picu A, Petcu L, Ştefan S, Mitu M, Lixandru D, Ionescu-Tîrgovişte C, et al.** Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Romanian Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity. *Molecules 2017;* 22(5): 714.

20. **Wang S, Gu J, Xu Z, Zhang Z, Bai T, Xu J, et al.** Zinc rescues obesity-induced cardiac hypertrophy via stimulating metallothionein to suppress oxidative stress-activated BCL10/CARD9/p38 MAPK pathway. *J Cell Mol Med 2017;* 21(6): 1182-1192.

21. **McMurray F, Patten DA, Harper ME.** Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity-Recent Findings and Empirical Approaches. *Obesity (Silver Spring) 2016;* 24(11): 2301-2310.

22. **Staford P, Abdelwahab MG, Kim DY, Preul MC, Rho JM, Scheck AC.** The ketogenic diet reverses gene expression patterns and reduces reactive oxygen species levels when used as an adjuvant therapy for glioma. *Nutr Metab (Lond) 2010; 7*: 74.

23. **Ahola-Erkkila S, Carroll CJ, Peltola-Mjosund K, Tulkki V, Mattila I, SeppanenLaakso T, et al.** Ketogenic diet slows down mitochondrial myopathy progression in mice. *Hum Mol Genet 2010;* 19(10): 1974–1984.

Полови хормони при мъже със захарен диабет тип 1

Илиева-Герова, Мария И. [1], Колева-Тютюнджиева, Даниела И. [1], Няголова, Пресияна В.[1], Орбецова, Мария М. [1], Райчева, Ралица Д[2]., Денева, Таня И. [3]

[1] Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, Катедра по Ендокринология, МФ, МУ, Пловдив
[2] Катедра Социална Медицина и Обществено здраве, ФОЗ, МУ, Пловдив
[3]Централна Клинична лаборатория, УМБАЛ „Св. Георги“, ФФ, МУ, Пловдив

Адрес за кореспонденция:
Д-р Мария Илиева-Герова,
Клиника по Ендокринология и болести на обмяната,
УМБАЛ „Св. Георги“, МУ, Пловдив
Бул. „Васил Априлов“ 15А, Пловдив – 4000,
e-mail: mimilieva@yahoo.com

Постъпване: 02. 06. 2022
Приемане: 04. 06. 2022

Резюме

Захарният диабет като хронично метаболитно заболяване е добре известно със своите системни ефекти в резултат на повлияване метаболизма на въглехидрати, протеини и мазнини. Документирана и подробно изучена е връзката между захарния диабет тип 2 (ЗДт2), инсулиновата резистентност и метаболитния синдром, както и свързаните с тези състояния нарушена репродуктивната функция, промяна в нивата на андрогените и развитие на хипогонадизъм при мъже. Захарен диабет тип 1 (ЗДт1) с водещи инсулинопения и хипергликемия също се асоциира с известно повлияване на хиполамо-хипофизо-гонадната ос (ХХГ), фертилитета и хормоналните показатели на мъжете, а точните механизми на увреда са въпрос на широк научен дебат.

Цел на проучването е да се срвънят серумните нива на андрогените при мъже със ЗДт1 и съответни по възраст и ИТМ клинично здрави мъже в репродуктивно активна възраст.

Материали и методи: Проучването обхваща 71 лица – 30 мъже със ЗДт1 и 41 клинично здрави мъже, служещи за контролна група. Снета е подробна анамнеза по отношение давност на заболяването, прилагани инсулини, обща дневна доза инсулин (ОДД). При всички участници са извършени антропометрични измервания: тегло, ръст, обиколка на талия (Т) и ханша (Х), изчислени са индекс на телесна маса (ИТМ) и Т/Х. Изследвани са базални нива на лутеинизиращ хормон (LH), фоликулостимулиращ хормон (FSH), естрадиол (E2), тестостерон (T), полови – хоромони свързващ глобулин (SHBG), дехидроепиандростерон-сулфат (DHEA-S), тиреостимулиращ хормон (TSH), серумен пролактин (Prl), адренокортикотропен хормон (ACTH), сутрешен кортизол (corisol 8h). Изчислени са: свободен андрогенен индекс (FAI), свободен тестостерон (cFT) и бионаличен тестотерон (BioT). Оценен е гликемичния контрол чрез кръвна захар на гладно (FBG), гликиран хемоглобин (HbA_{1C}) и микроалбуминурия (U-ALB). Биохимичните изследвания включват изследване нивата на общ белтък (TPROT), албумин (ALB) и креатинин (CREA).

Резултати: Средната възраст на изследваните мъже е 31,72±6,05 г., като не се установява статистически значима разлика по отношение на този показател между лицата със ЗДт1 и контролите (p=0,944). Средният ИТМ е 24,87±6,03 кг/м², отново без сигнификантна разлика между двете изследвани групи (p=0,537). Мъжете със ЗДт1 са с по-голяма обиколка на талията (p<0,05) и повишено

отношение T/X (p=0,000), но с по-малка обиколка на ханша (p<0,05). Нивата на HbA_{1C} и FBG са статистически значимо по-високи при мъжете със ЗДт1 спрямо здравите контроли (p=0,000, респ.). Всички участници са с нормални нива на общ белтък и албумин при липса на статистически значима разлика на тези показатели между двете групи (p=0,188, p=0,600, респ.). Лицата в настоящето проучване са с еутиреоидна функция, нормопролактинемия, нормални нива на сутрешен кортизол и АСТН. Мъжете със ЗДт1 са със статистически значимо по-високи нива на SHBG (p=0,000) и по-ниски нива на FAI спрямо контролите (p=0,004). Не се достигна статистически значима разлика по отношение нива на T и cFT (p=0,101, p=0,465, респ.). В групата на ЗДт1 прави впечатление тенденцията към по-ниски нива на BioT спрямо контролната група, без това да достига статистически значима разлика (p=0,071). Не се откриват сигнификатни разлики и по отношение нивата на LH, FSH, LH/FSH и E2 между двете групи мъже (p=0,126, p=0,553, p=0,284, p=0,900, респ).

Заключение: Мъже със ЗДт1 със средна давност на заболяването 10 г. и липса на диабетна макроангиопатия и диабетна нефропатия нямат данни за изразен андрогенен дефицит и са със съпоставими спрямо здравите мъже в репродуктивно активна възраст нива на полови хормони.

Ключови думи: захарен диабет тип 1, гонадотропни хормони, пролактин, тестостерон, SHBG, FAI.

Въведение

От края на 17 век датират съобщения за връзката между нарушената репродуктивна функция и захарния диабет, но усиленото изучаване на асоциацията между нивата на тестостерона и метаболитното заболяване започват през 60-те години на 20-ти век (1). Репродуктивната функция е жизнено важна за индивида и зависи от финитe механизми на регулация и взаимодействие между хипоталамуса, хипофизата и гонадите, обединени в т. нар. хипоталамо-хипофизо-гонадна ос (ХХГ) ос (2). Хипоталамичният декапептид гонадотропин-рилийзинг хормонът (GnRH) действа върху хипофизарните гонадотрофи и стимулира пулсативната секреция на гонадотропините. Лутеинизиращият (LH) и фоликулостимулиращият хормон (FSH) активират соматичните клетки в гонадите за синтез на стероидни и пептидни хормони, подпомагайки сперматогенезата. Пулсативната секреция на GnRH е изключително чувствителна към метаболитни фактори, хормони и периферни сигнали, които са с особено голямо значение за поддържане на връзката хомеостаза-репродукция (3). Сред тях са инсулинът и кръвната захар, поради което патологични състояния, свързани с остра или хронична хипер- или хипоинсулинемия, хипер- или хипогликемия, могат да нарушат лесно ХХГ ос (4). Андрогените, с главен представител тестостеронът, са хормони, участващи в диференцирането на външните и вътрешни полови органи при мъжете, в поддържането и развитието на вторичните полови белези и репродуктивната функция, оказват влияние върху метаболизмана протеини, въглехидрати и масти, повлияват поведението и когнитивните способности (5).

Добре известно е, че мъжете със захарен диабет тип 2 (ЗДт2) имат по-ниски нива на тестостерон в сравнение с общата популация, което се асоциира с намалена инсулинова чувствителност и инсулинова резистентност (ИР) (6). Метаболитният синдром (МС), повишеното отлагане на висцерална мастна тъкан, ИР са независим рисков фактор за повишен сърдечно-съдов (СС) риск и повлияват не само качеството на живот, но и неговата продължителност (7). Влиянието на ЗДт1 върху репродуктивната функция при мъже продължава да бъде не изцяло изучено и разбрано. Инсулинопенията и хипергликемията, като водещи патофизиологични механизми при ЗДт1, биха могли да имат потенциален ефект върху гонадната функция на мъжете (8). Проучвания при експериментални животни със ЗДт1 демонстрират смутена сперматогенеза, повишена честота на тератозооспермия, намалено тегло на епидимите, потиснати нива на LH и FSH и тестостерона, понижено либидо (9,10). Известно е, че хипергликемията и свързаните с нея повишено натрупване на крайни продукти на гликирането, участват в патогенезата на съдовите усложнения при ЗД (11). Повишен оксидативен стрес, засилена ДНК фрагментация на сперматозоидите, потисната ХХГ ос, смутена сперматогенеза, еректилна дисфункция са сред обсъжданите нарушения при ЗДт1 (12,13). По отношение нивата на андрогените при мъже със ЗДт1, данните в литературата са противоречиви, което ни мотивира да проведем настоящето проучване.

Целта е да се изследват нивата на андрогените при мъже със ЗДт1 като се извърши сравнителен анализ на показатели спрямо съответни по възраст и ИТМ клинично здрави мъже в репродуктивно активна възраст.

Материали и методи

Настоящото проучване представлява трансверзално, обсервационно, тип случай-контрола проучване при 31 мъже със ЗДт1 и 41 метаболитно здрави контроли. Проучването е проведено в Клиника по Ендокринология и болести на обмяната при УМБАЛ „Св. Георги" – Пловдив в период м. януари 2018 г. – м. декември 2020 г. Доброволното участие на лицата от проучванията е удостоверено чрез предварително подписано информирано съгласие в съответствие с Декларацията от Хелзинки. Изследването е одобрено от Комисията по Научна етика към съвета по Научно-изследователска дейност при Медицински Университет, Пловдив.

Критерии за включване в проучването са липса на: ЗД тип 2, наличие на сърдечна, дихателна, бъбречна или чернодробна недостатъчност, пролиферативна ретинопатия, диабетна макроангио - патия, диабетна нефропатия, наличие на остра декомпенсация на метаболитното заболяване към момента на провеждане на изследванията, лечение на хронична съпътстваща патология, което би могло да повлияе хормонални те показатели.

При всички участници в проучването са извършени следните антропометрични измервания: тегло, ръст, изчислен е индекс на телесна маса по стандартната формула (14). Измерени са обиколка на талията – по средата на разстоянието между долния ръб на ребрената дъга и илиачните гребени, а обиколката на ханша – на нивото на големите трохантери. Изследванията са проведени в изправено положение с прибрани крака и ръце с шивашки метър. Изследвани са базални нива на лутеинизиращ хормон (LH), фоликулостимулиращ хормон (FSH), естрадиол (E2), общтестостерон (T), полови – хоромони свързващ глобулин (SHBG), дехидроепиандростерон-сулфат (DHEA-S), тиреостимулиращ хормон (TSH), серумен пролактин (Prl), адренокортикотропен хормон (ACTH), сутрешен кортизол (corisol 8h).

Изчислени са: свободен андрогенен индекс (FAI), използвана е следната формула за изчисление: Testosterone (nmol/l) x 100/ SHBG (nmol/l). Концентрациите на тестостерона са преизчислени от ng/ml в nmol/l чрез препоръчания от фирмата производител на тест-набора коефициент F = 3,47, т.е. 1 ng/ml x 3,47 = 1 nmol/l. Калкулирани по формулата на Vermeulen са свободен тестостерон (cFT) и бионаличен тестостерон (bioT) (15). Гликемичният контрол е оценен чрез кръвна захар на гладно (FBG), гликиран хемоглобин (HbA_{1C}) и микроалбуминурия (U-ALB). Изследвани са също общ белтък (TPROT) и албумин (ALB) и серумен креатинин (CREA).

Венозната кръв за лабораторните изследвания е взимана при стандартни условия – сутрин рано, след 12-часов период на нощно гладуване. Всички клинично-лабораторни изследвания са извършени в Централна Клинична Лаборатория при УМБАЛ „Свети Георги" – ЕАД Пловдив. За всички изследвани показатели се извършва системен вътрелабораторен контрол и външна оценка на качеството чрез участие в национални и международни програми, за което лабораторията разполага със съответните сертификати. Серумни концентрации на LH, FSH, E2, T, SHBG, Prl, DHEA-S, cortisol 8h, ACTH, TSH са изследвани чрез имуноензимен анализ с хемилуминисцентна детекция, анализатор: Access 2 Immunoassay System, Beckman Coulter, Inc., US. *Гликираният хемоглобин е изследван с турбидиметричен имуноинхибиращ метод след хемолиза на еритроцитите в пълна кръв на автоматичен клинично-химичен анализатор AU 480,* Beckman Coulter (USA). Микроалбуминурията *в 24-часова диуреза е определена с имунотурбидиметричен метод на автоматичен клинично-химичен анализатор* AU 480, Beckman Coulter (USA). Клинично-химичните показатели са извършени на клинично-химичен анализатор AU 480, Beckman Coulter (USA) по оригинални програми с конвенционални аналитичните принципи на използваните методи.

Данните са представени с методи на дескриптивната и инферентна статистики. Първоначално количествените променливи са тествани за нормалност на статистическото разпределение чрез теста на Шапиро-Уилк. Всички с нормално разпределение са описани със средна аритметична ± стандартно отклонение (SD). Сравненията между две групи са анализирани с t-тест за независими извадки. При липса на нормално разпределение данните са описани с медиана и интерквартилен размах (IQR). Сравненията между групите са извършени с помощта на непараметричните тестове на Ман-Уитни за две независими групи. Статистическият анализ на данните е извършен с помощта на SPSS v.26 за Windows (IBM Corp., 2019 г. Армонк, Ню Йорк: IBM Corp). За всички тестове p-стойност <0,05 се отчита като статистически значима.

Резултати

Резултатите от проведените антропометрични изследвания са представени в *Таблица 1.* Средната възраст на изследваните мъже е 31,72±6,05 г., като не се установява статистически значима разлика между лицата със ЗДт1 и контролите по отношение на този показател (p=0,944). Средният ИТМ е 24,87±6,03 кг/м^2, от-

ново без статистически значима разлика между двете групи мъже (p=0,537). Лицата със ЗДт1 са с по-голяма обиколка на талията (p<0,05) и повишено отношение Т/Х (p=0,000), но с по-малка обиколка на ханша (p<0,05) *(Табл. 1)*.

В *Таблица 2* са показани резултатите на извършените биохимичните изследвания на всички участници. Очаквано, нивата на HbA_{1C} и кръвна захар на гладно са по-високи при мъжете със ЗДт1 спрямо здравите контроли (p=0,000, респ.). Средната продължителност на ЗДт1 е 10,47±5,59 г., средна ОДД 55,77±17,32Е. При всички участници се установиха нормални нива на общ белтък и албумин, без статистически значима разлика между тези показатели при двете групи (p=0,188, p=0,600, респ.). Мъжете със ЗДт1 не се представят с повишена екскреция на албумин в урината *(Табл. 2)*.

Резултатите от извършените хормонални изследвания са представени в *Таблица 3*. Всички участници са еутиреоидни, с данни за нормопролактинемия. В групата на ЗДт1 нивата на серумния пролактин са с тенденция към по-ниски, но не се достига до сигнификатна разлика спрямо здравите контроли – нивото на значимост е гранично (p=0,058). Изключена е първична надбъбречно-корова недостатъчност чрез резултатите за референтни стойности на сутрешен кортизол и АСТН. Мъжете със ЗДт1 се оказват със статистически значимо по-високи нива на SHBG спрямо контролите (p=0,000), което дава отражение на FAI – групата на ЗДт1 е със сигнификантно по-ниски стойности спрямо контролната група (p=0,004). Липсва статистически значима разлика по отношение нива на общ серумен тестостерон и изчислен свободен тестостерон (p=0,101, p=0,465, респ.). В групата ЗДт1 се отчита тенденция към по-ниски нива на BioT спрямо контролната група, без това да достига статистически значима разлика (p=0,071). Двете групи мъже не се различават сигнификантно по отношение нива на LH, FSH, LH/FSH (p=0,126, p=0,553, p=0,284). Липсват данни за отклонения в нивата на естрогените, като няма статистически разлики между двете групи (p=0,900) *(Табл. 3)*.

Обсъждане

В настоящето проучване липсват данни за хипогонадотропен хипогонадизъм сред мъже със ЗДт1 в репродуктивно активна възраст. Нивата на общ и изчислен свободен тестостеронпри мъжете със ЗДт1 не се различават сигнификатно от тези при здравите контроли. Тези резултати потвърждават и предишни изследвания. Tomar и сътр. съобщават за нормални нива на общ Т сред мъже със ЗДт1 – в средата на референтния интервал, сравними с тези на общата популация мъже (16). В друго проучване сред 121 здрави мъже и 93 със ЗДт1 също не се откриват сигнификантни разлики в нивата на общ Т, както и корелации на андрогена с еректилната дисфункция (17). Van Dam и сътр. изследват 52 мъже със ЗД тип 1 без микроваскуларни усложнения, сравнявайки ги с 53 съответни по възраст и индекс на телесна маса (ИТМ) здрави контроли. Резултатите показват, че пациентите със ЗД тип 1 имат сходни нива на тестостерон ипо-високи SHBG, както и тенденция към по-нисък свободен тестостерон спрямо здравите контроли (18). Оценявайки хормонален статус, еректилна функция, депресия и качество на живот, Hylmarova и сътр. провеждат проучване сред 57 пациента

Таблица 1.

Антропометрични показатели при изследваните групи мъже

Групи / Показател	ЗДт1 (n=30)	Контроли (n=41)	P – value
Възраст (години) *median; IQR*	32;8	32;9	0,944[1]
ИТМ (кг/м²) *mean±SD*	24,61±2,86	25,06±2,02	0,537°
Обиколка талия (см) *mean±SD*	83,6±9,18	80,6±6,74	**<0,05**°
Обиколка ханш (см) *mean±SD*	95,4±7,37	98,8±6,59	**<0,05**°
Т/Х *mean±SD*	0,85±0,08	0,81±0,03	**0,000**°

° – T-test;
[1]– Mann-Withey U test

Таблица 2.

Биохимични показатели на двете групи мъже.

(N) Показател	ЗДт1 (n=37)	Контроли (n=41)	P – value
FBG (mmol/l) *mean±SD*	7,92±2,27	5,07±0,24	**0,000**°
HbA_{1c} (%) *mean±SD*	8,24±1,24	4,96±0,23	**0,000**°
ALB (g/l) *mean±SD*	43,43±2,04	44,95±2,86	0,600°
TPROT (g/l) *mean±SD*	68,72±4,08	69,96±3,85	0,188°
CREA (µmol/l) *median; IQR*	78,5;12	88;13,5	**0,004**[1]
U-ALB (ug/min) *median; IQR*	8,9;26,05	–	–

° – T-test;
[1]– Mann-Withey U test

Таблица 3.

Хормонални показатели на изследваните групи мъже

(N) Показател	ЗДт1 (n=37)	Контроли (n=41)	P – value
	Median; IQR	Median; IQR	
LH (IU/l)	4,28;2,02	4,61;1,44	0,126[1]
FSH (mIU/ml)	4,77;2,89	4,87;2,15	0,553[1]
LH/FSH	0,83;0,36	0,91;0,28	0,284[1]
E2 (pg/ml)	29,64;13,48	30,80;12,40	0,900[1]
T (mg/ml)*	5,02±1,12	4,64±0,90	0,101°
SHBG (nmol/l)	38,8;17,40	28,60;10,15	**0,000**[1]
FAI	47,82;24,09	62,64;21,28	**0,004**[1]
cFT (ng/ml)	0,091;0,04	0,097±0,03	0,465[1]
BioT (ng/ml)*	2,26±0,70	2,48±0,50	0,071
Prl (mU/l)	146,79;79,07	171,51;67,54	*0,058*[1]
TSH (mU/l)	1,79;0,87	1,82;1,18	0,688[1]
DHEA-S (µg/dl)*	269,05±76,14	283,04±72,75	0,328°
ACTH (pg/ml)*	28,95±9,30	28,44±9,57	0,854°
Cortisol 8h (nmol/l)*	438,04±107,45	406,64±105,05	0,279°

° – T-test;
[1]– Mann-Withey U test

със ЗД тип 1 на възраст 18-50 г. със средна продължителност на заболяването 15 г. Отново нивата на общия тестостерон не се различават съществено между диабетиците и здравите контроли (19). От друга страна, изследвайки хормоналния профил на 69 мъже със ЗДт1, Grossmann и сътр. съобщават за сигнификантно по-нисък тестостерон. По-високият ИТМ и наднорменото тегло сред участниците в това проучване би могло да допринася за тези резултати (20). Добре известна е връзката между ЗДт2 и ИТМ (21). Ниските нива на тестостерона при пациенти със ЗДт2 и метаболитен синдром се обясняват с повишената ароматазна активност в адипоцитите и повишените нива на естрадиол, които потискат ХХГ ос и съответно водят до намаляване нивата на Т (22). В нашето проучване мъжете със ЗДт1 са с нормално

телесно тегло и липсват данни за затлъстяване, което може да бъде сред основанията за референтните нива на общия тестостерон.

SHBG е основният транспортен протеин, който се секретира от черния дроб и при мъже в репродуктивна възраст и свързва около 60% от общия тестостерон в кръвообращението. Мета анализ на над 50 обсервационни проучвания и малко над 20 хиляди мъже, потвърждава връзката между ниските нива на SHBG с метаболитния синдром и ЗДт2, както и отрицателната корелация между инсулиновата резистентност и нивата на глобулина (23). Повечето проучвания сред мъже със ЗДт1, обаче, демонстрират по-високи нива на SHBG спрямо здравите контроли (16,17,19,24). В нашето проучване мъжете със ЗДт1 са със сигнификантно по-високи нива на SHBG спрямо здравите контроли. Известен е инхибиторния ефект на инсулина върху SHBG (25). Намерена е съществена разлика в нивата на SHBG при пациенти със субкутанно приложение на инсулин и такива с интраперитонеално инсулиново приложение (26). Поради хипоинсулинемията при ЗДт1 порталната инсулинова концентрация е намалена, а подкожно приложеният, пропускайки first pass ефекта на черния дроб е в недостатъчно количество, за да упражнява своя инхибиторен ефект върху SHBG. Това води до повишени нива в циркулацията на последния при мъже със ЗДт1 (19).

Тези резултати за SHBG имат отношение и към FAI и cFT. Свободният тестостерон, несвързаната с протеини фракция, е биологично активната. Тя осъществява тъканните ефекти на андрогените като се свързва със специфичните ядрени рецептори (5). Директното измерване е трудно приложимо, ето защо са разработени математически модели, с помощта на които свободният тестостерон да бъде изчислен. В нашето проучване FAI е сигнификантно по-нисък при мъжете със ЗДт1 спрямо здравите контроли, при липса на статистически значима разлика по отношение нивата на cFT. Тези резултати са подобни на други автори. Не е доказана корелация на FAI с гликемичния контрол, продължителността на заболяването или данните за еректилна дисфункция (19), но съществува негативна корелация с ИТМ (16). Понижени нива на FAI и cFT съобщават някои автори (18-20), което в съчетаниес повишените нива на SHBG демонстрира тенденция към хипогонадизъм сред мъжете със ЗДт1.

В търсене на обяснение за функционирането на ХХГ ос при диабетици, Bassetі и сътр. изследват секрецията на гонадотропините в отговор на екзогенно приложен GnRH. Провеждат също и електронна микроскопия за търсене на аномалии на ниво сперматозоиди. Резултатите показват понижен отговор на LH и FSH към GnRH, значително по-нисък мотилитет на сперматозоидите и по-висок процент на незрели и склонни към апоптоза такива, отколкото при здрави контроли (27). В друго проучване Lopez и сътр. изследват млади диабетици със ЗДт1 без системни усложнения от заболяването и с кратка давност - 3,7г. Авторите демонстрират, че пациенти с лош гликемичен контрол имат по-ниска ендогенна пулсова честота на LH и понижен отговор на LH към епизодично прилагане на екзогенен GnRH (28). Заключението е, че липсата на отговор произтича от непосредствените ефекти на диабета, а не от дългосрочните усложнения на заболяването (каквито в случая липсват).

В настоящето проучване нивата на гонадотропните хормони при мъже със ЗДт1 не се отличават съществено от тези на здравите контроли. Някои автори докладват по-високи нива на LH сред мъжете със ЗДт1 при съпоставими за FSH спрмо здравите контроли, като резултатите авторите обясняват с по-ниските нива на FAI и cFT (поради нормален общ серумен тестостерон), който стимулира секрецията на LH (19).

Мъжете със ЗДт1 в нашето проучване се представят с голяма обиколка на талията и повишено отношение Т/Х спрямо здравите контроли. ИТМ е един от най-често използваните в ежедневната клинична практика за скрининг на затлъстяването, но той не е показател за разграничаване на мускулна от мастна тъкан (29). От друга страна отношението Т/Х се използва за надеждна оценка на преразпределението на МТ в тялото и определяне на вида затлъстяване, като служи и за неинвазивна оценка на СС риск (30). В световната литература се натрупват все повече данни за повишена честота на МС сред пациентите със ЗДт1 (32,33), както и за връзката на последния с микро- и макроваскуларните усложнения (31). Въпреки липсата на диабетна макроангиопатия, нефропатия и пролиферативна ретинопатия, мъжете със ЗДт1 в нашето проучване са с повишено отношение Т/Х. Връзка на показателя с гликемичния контрол, давността на заболяването, ОДД са обект на бъдещи научни разработки.

В заключение, мъжете със ЗДт1 имат съпоставими нива на полови хормони със съответни по възраст и ИТМ клинично здрави мъже в репродуктивно активна възраст. С оглед изясняване на патогенезата на демонстрираните резултати - по-високи стойности на SHBG и по-нисък FAI при ЗДт1, е необходима по-задълбочена оценка на показателите на гликемичния контрол, давността на заболяването, дозите на прилаганите инсулини.

Sex Hormones in Men with Type 1 Diabetes Mellitus

Ilieva-Gerova, Maria I.[1], Koleva-Tyutyundzhieva, Daniela I.[1], Nyagolova, Presiana V.[1], Orbetzova, Maria M.[1], Raycheva, Ralitsa D.[2], Deneva, Tanya I.[3]

[1] Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, „Sv. Georgy" University General Hospital, Department of Endocrinology, Medical Faculty, Medical University of Plovdiv

[2] Department of Social Medicine and Public Health, Faculty of public health, Medical University of Plovdiv

[3] Central Clinical Laboratory, „Sv. Georgy" University General Hospital, Faculty of Medicine, Medical University of Plovdiv

Address for correspondence:
Dr. Maria Ilieva-Gerova,
Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases,
„Sv. Georgy" University General Hospital, Medical University of Plovdiv
15A „Vasil Aprilov", blvd Plovdiv – 4000,
e-mail: mimilieva@yahoo.com

Submitted: 02. 06. 2022
Accepted: 04. 06. 2022

Abstract

Diabetes mellitus as a chronic metabolic disease is well known for its systemic effects as a result of affecting the metabolism of carbohydrates, proteins and fats. The relationship between type 2 diabetes mellitus (DM2), insulin resistance and metabolic syndrome, as well as related reproductive disorders in men, and changes in androgen levels and the development of hypogonadism have been documented and studied in detail. Type 1 diabetes mellitus (DM1) with leading insulinopenia and hyperglycaemia has also been linked to the influence of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG axis) and fertility where hormonal parameters in men, and the exact mechanisms of damage are the subject of widespread scientific debate.

The ***aim of the study*** was to compare serum androgen levels in men with DM1 and age- and BMI-matched clinically healthy men of active reproductive age.

Materials and methods: The study included 71 individuals – 30 men with DM1 and 41 clinically healthy men serving as a control group. A detailed medical history related to disease duration, insulin administered, total daily insulin dose (TDI) was taken. Anthropometric measurements of weight, height, waist (W) and hip circumference (H) were performed on all participants, body mass index (BMI) and W/H were calculated. Basal levels of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E2), testosterone (T), sex hormone binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), thyroid stimulating hormone (TSH), serum prolactin (Prl), adrenocorticotropic hormone (ACTH), morning cortisol (corisol 8h) were studied. Free androgen index (FAI), calculated free testosterone (cFT) and bioavailable testosterone (BioT) were calculated. Fasting blood glucose (FBG), glycated hemoglobin (HbA_{1C}) and microalbuminuria (U-ALB) were assessed. Biochemical studies had been expanded to include levels of total protein (TPROT), albumin (ALB) and creatinine (CREA).).

Results: The mean age of the studied men was 31,72± 6,05 years, and no statistically significant difference was found in this indicator between the persons with DM1 and the controls (p = 0,944). The mean BMI was 24,87± 6,03 kg/m^2, again without significant difference between the two study groups (p=0,537). Men with DM1 had been found to have a larger waist circumference (p<0,05) and increased W/H ratio (p = 0,000), but a smaller hip circumference (p<0,05). HbA_{1C} and FBG levels were statistically significantly higher in men with DM1 compared to healthy controls (p=0,000, respectively). All participants had normal levels of total protein and albumin in the absence of statistically significant differences in these indicators between the two groups (p=0,188, p=0,600, respectively). The participants in the present study had euthyroid function, normoprolactinaemia, normal morning cortisol and ACTH levels. Men with DM1 had statistically significantly higher SHBG levels (p=0,000) and lower FAI levels compared to controls (p=0,004).

No statistically significant difference was found in terms of T and cFT levels (p=0,101, p=0,465, respectively). Lower levels of BioT compared to the control group were noticeable in the DM1 group, but without reaching a statistically significant difference (p=0,071). There were no significant differences in the levels of LH, FSH, LH / FSH and E2 in the two groups of men (p=0,126, p=0,553, p=0,284, p=0,900, respectively).

Conclusion: Men with DM1 with mean disease duration of 10 years and no diabetic macroangiopathy and diabetic nephropathy had no evidence of androgen deficiency and were comparable to healthy men in active reproductive age respective of sex hormone levels.

Key words: type 1 diabetes mellitus, gonadotropins, prolactin, testosterone, SHBG, FAI.

Introduction

The link between impaired reproductive function and diabetes dates back to the late 17th century, but intensive study of the association between testosterone levels and metabolic disease began in the 1960s (1). Reproductive function is vital for the individual and depends on the subtle mechanisms of regulation and interaction between the hypothalamus, pituitary gland and gonads, united in the so-called HPG axis (2). The hypothalamic decapeptide gonadotropin hormone-releasing hormone (GnRH) acts on the pituitary gonadotrophs and stimulates the pulsatile secretion of gonadotropins. The luteinizing (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) activate somatic cells in the gonads to synthesize steroid and peptide hormones, supporting spermatogenesis. Pulsatile secretion of GnRH is extremely sensitive to metabolic factors, hormones and peripheral signals, which are particularly important for maintaining the relationship between homeostasis and reproduction (3). Insulin and blood sugar are amongst the latter, so pathological conditions associated with acute or chronic hyper- or hypoinsulinemia, hyper- or hypoglycaemia can easily disrupt the HPG axis (4). Androgens, with testosterone being the main representative, are hormones involved in the differentiation of external and internal genitalia in men. They also take part in the maintenance and development of secondary sex characteristics and the reproductive function. They affect the metabolism of proteins, carbohydrates and fats and determine behavior and cognitive abilities (5).

It is well known that men with type 2 diabetes mellitus (DM2) have lower testosterone levels than the general population, which is associated with reduced insulin sensitivity and insulin resistance (IR). (6). Metabolic syndrome (MS), increased visceral adipose tissue deposition, and IR are independent risk factors for increased cardiovascular (CV) risk and have their impact not only on the quality of life but also on its span. (7). The effect of DM1 on the male reproductive function remains unclear – not entirely studied or understood. Insulinopenia and hyperglycaemia, as leading pathophysiological mechanisms in DM1, could have a potential effect on the gonadal function in men (8). Studies in experimental animals with DM1 have shown impaired spermatogenesis, increased incidence of teratozoospermia, decreased weight of epididymides, suppressed LH and FSH and testosterone levels, decreased libido (9,10). It is known that hyperglycaemia and the associated increased accumulation of glycation end products are involved in the pathogenesis of vascular complications in DM (11). Increased oxidative stress, higher DNA fragmentation of sperm, suppressed HPG axis, impaired spermatogenesis and erectile dysfunction are among the disorders discussed in DM1 (12,13). Regarding androgen levels in men with DM1, the data in the literature are contradictory, which motivated us to conduct the present study.

The aim is to study androgen levels in men with DM1 compared to clinically healthy men in active reproductive age of similar age and BMI by performing a comparative analysis of indicators.

Materials and methods

The present study was a transversal, observational, case-control study in 31 men with DM1 and 41 metabolically healthy controls. The study was conducted at the Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases at the „Sv. Georgy" University General Hospital in Plovdiv in the period January 2018 – December 2020. Voluntary participation of study participants was certified by pre-signed informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Scientific Ethics committee of the Department of Science and Research at the Medical University of Plovdiv.

Inclusion criteria for the study were: lack of proven type 2 diabetes; history of heart, respiratory, renal or hepatic failure, proliferative retinopathy, diabetic macroangiopathy, diabetic nephropathy, acute decompensation of metabolic disease at the time of treatment, treatment of concomitant chronic pathology, which could affect hormonal parameters.

The following anthropometric measurements were performed on all participants: weight, height and body mass index was calculated according to the standard formula (14). Waist circumference was measured in the middle of the distance between the lower edge of the costal arch and the iliac crests, and the hip circumference was measured at the level of the large trochanters.

The measurements were performed in an upright position with adducted legs and arms with the help of a sewing tape measure. Basal levels of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E2), testosterone (T), sex hormone binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), thyroid stimulating hormone (TSH), serum prolactin (Prl), adrenocorticotropic hormone (ACTH), morning cortisol (corisol 8h) were studied. The free androgen index (FAI), was calculated where the following formula was used: *Testosterone (nmol/l) x 100/SHBG (nmol/l)*. Testosterone concentrations were recalculated from ng/ml into nmol/l using the test kit manufacturer's recommended coefficient F = 3,47, ie. 1 ng/ml x 3,47 = 1 nmol/l. Calculated free testosterone (cFT) and bioavailable testosterone (bioT) were calculated according to the Vermeulen formula (15). Glycemic control was assessed by fasting blood sugar (FBG), glycated hemoglobin (HbA_{1C}) and microalbuminuria (U-ALB). Total protein (TPROT) and albumin (ALB) and serum creatinine (CREA) were also studied.

Venous blood for laboratory tests was taken under standard conditions - early in the morning, after a 12-hour period of night fasting. All clinical and laboratory tests were performed in the Central Clinical Laboratory at the „Sv. Georgy" University General Hospital in Plovdiv. Systematic intra-laboratory control and external quality assessment were performed for all studied indicators through participation in national and international programs, for which the laboratory has the relevant certificates. Serum concentrations of LH, FSH, E2, T, SHBG, Prl, DHEA-S, cortisol 8h, ACTH, TSH were tested by enzyme-linked immunosorbent assay with chemiluminescent detection, done with the Access 2 Immunoassay System, Beckman Coulter, Inc., US analyzer. Glycated hemoglobin was tested by turbidimetric immunoinhibitory method after hemolysis of erythrocytes in whole blood using the automatic clinical chemistry analyzer AU 480, Beckman Coulter (USA). Microalbuminuria in 24-hour diuresis was determined by immunoturbidimetric method of the automatic clinical chemistry analyzer AU 480, Beckman Coulter (USA). The clinical and chemical indicators were performed on a clinical chemistry analyzer AU 480, Beckman Coulter (USA) according to original programs with conventional analytical principles of the used methods.

Data were presented by methods of descriptive and inferential statistics. Initially, the quantitative variables were tested for normality of the statistical distribution by the Shapiro-Wilk test. All with normal distribution were described with arithmetic mean ± standard deviation (SD). Comparisons between two groups were analyzed by t-test for independent samples. In the absence of a normal distribution, data were described with median and interquartile range (IQR). Comparisons between groups were performed usingthe non-parametric Mann-Whitney tests for two independent groups. Statistical analysis of the data was performed using SPSS v.26 for Windows (IBM Corp., 2019 Armonk, New York: IBM Corp). A p-value of <0,05 was considered statistically significant for all tests.

Results

The results of the conducted anthropometric studies are presented in *Table 1*. The mean age of the men studied was 31,72 ± 6,05 years of age, with no statistically significant difference between the DM1 group and controls (p=0,944). The mean BMI was 24,87 ± 6,03 kg / m^2, again without a statistically significant difference between the two groups of men (p = 0,537). Individuals with DM1 had a larger waist circumference (p <0,05) and increased W/H ratio (p = 0,000), but with a smaller hip circumference (p<0,05). *Table 2* shows the results of the performed biochemical studies of all participants. As expected, fasting HbA_{1C} and fasting blood sugar levels were higher in men with DM1 compared to healthy controls (p = 0,000, respectively). The mean duration of DM1 was 10,47 ± 5,59, mean TDI 55,77 ±17,32E. Normal levels of total protein and albumin were found in all, with no statistically significant difference in these indicators between the two groups (p = 0,188, p = 0,600, respectively). Men with DM1 did not present increased urinary albumin excretion.

The results of the performed hormone tests are presented in *Table 3*. All participants were euthyroid, with evidence of normoprolactinemia. In the DM1 group, serum prolactin levels were lower in the absence of a significant difference from healthy controls. (p=0,058). Primary adrenocortical insufficiency was ruled out by results for morning cortisol and ACTH reference values. Men with DM1 had statistically significantly higher levels of SHBG than controls (p=0,000). Regarding FAI – the group of DM1 had significantly lower values compared to the control group (p = 0,004). There is no statistically significant difference between total serum testosterone levels and calculated free testosterone (p = 0,101, p = 0,465, respectively). In the DM1 group, lower levels of BioT were reported compared to the control group, without reaching a statistically significant difference (p = 0,071). The two groups of men did not differ significantly in terms of LH, FSH, LH / FSH levels (p = 0,126, p = 0,553, p = 0,284). There are no data on deviations in estrogen levels, in the absence of statistical significance between the two groups (p = 0,900).

Discussion

The present study did not yield evidence of hypogonadotropic hypogonadism in men with DM1 in active reproductive age. Total testosterone levels among men with DM1 did not differ significantly from those in healthy controls. These results are confirmed by previous studies. Tomar et al. reported normal levels of total

T among men with DM1 – in the middle of the reference interval, comparable to those of the general male population (16). Another study of 121 healthy men and 93 with DM1 also found no significant differences in total T levels or correlations of androgen and erectile dysfunction. (17). Van Dam et al. studied 52 men with type 1 diabetes without microvascular complications, comparing them with 53 healthy controls of identical age and body mass index (BMI). The results show that patients with type 1 diabetes have similar testosterone levels and higher SHBG, as well as a tendency to have lower free testosterone compared to healthy controls. (18). Assessing hormonal status, erectile function, depression and quality of life, Hylmarova et al. conducted a study among 57 patients with type 1 diabetes aged 18-50 years with an average disease duration of 15 years. Again, total testosterone levels did not differ significantly between diabetics and healthy controls (19). On the other hand, studying the hormonal profile of 69 men with DM1 Grossmann et al. reported significantly lower testosterone. Higher BMI and overweight among participants in this study could contribute to these results (20). The relationship between DM2 and BMI is well known (21). Low testosterone levels in patients with DM2 and metabolic syndrome are explained by increased aromatase activity in adipocytes and elevated estradiol levels, which suppress the HPG axis and lead to low T levels. (22). In our study, men with DM1 were of normal body weight and lacked evidence of obesity, which may be among the reasons for reference testosterone levels.

SHBG is the major transporter protein secreted by the liver and in men of reproductive age binds about 60% of total testosterone in the bloodstream. A meta-analysis of more than 50 observational studies and just over 20,000 men confirmed the association between low SHBG levels with metabolic syndrome and and CFT levels have been reported by some authors (18,19,20), which in combination with elevated SHBG levels demonstrates a tendency for hypogonadism among men with DM1.

DM2, as well as the negative correlation between insulin resistance and globulin levels. (23). However, most studies in men with DM1 have shown higher levels of SHBG compared to healthy controls (16,17,19,24). In our study, men with DM1 had significantly higher levels of SHBG compared to healthy controls. The inhibitory effect of insulin on SHBG is known (25). A significant difference has been found in SHBG levels in patients with subcutaneous insulin administration and those with intraperitoneal insulin administration (26). Due to hypoinsulinemia in DM1, portal insulin concentration is reduced and subcutaneously administered insulin, avoiding the first pass effect of the liver, is insufficient to exert its inhibitory effect on SHBG. This leads to increased levels in the circulation of the latter in men with DM1.

These SHBG results are also related to FAI and cFT. Free testosterone, the non-protein fraction, is biologically active, exerts the tissue effects of androgens by binding to specific nuclear receptors (5). Direct measurement is difficult to apply, so mathematical models have been developed to calculate free testosterone.
In our study, FAI was significantly lower in men with DM1 compared to healthy controls, with no statistically significant difference in cFT levels. These results are similar to what other authors had concluded. FAI has not been shown to correlate with glycemic control, disease duration, or erectile dysfunction. (19), but there is a negative correlation with BMI (16). Decreased FAI

Table 1.

Anthropometric parameters in the studied groups of men.

Parameter \ Groups	DM1 (n=30)	Controls (n=41)	P – value
Age (years) *median; IQR*	32;8	32;9	0,944[1]
BMI (kg/m²) *mean±SD*	24,61±2,86	25,06±2,02	0,537°
Waist circumference (cm) *mean±SD*	83,6±9,18	80,6±6,74	**<0,05**°
Hip circumference (cm) *mean±SD*	95,4±7,37	98,8±6,59	**<0,05**°
W/H *mean±SD*	0,85±0,08	0,81±0,03	**0,000**°

° – T-test;
[1]– Mann-Withey U test

In search of an explanation for the functioning of the HPG axis in diabetics, Bacceti et al. investigated the secretion of gonadotropins in response to exogenously administered GnRH. They also performed electron microscopy to look for abnormalities at the sperm level. The results showed a lower response of LH and FSH to GnRH, significantly lower sperm motility and a higher percentage of immature and apoptosis-prone ones than in healthy controls. (27). In another study, Lopez et al. studied young diabetics with DM1 without systemic complications of the disease and with a short disease duration of 3,7 years. The authors demonstrated

Table 2.

Biochemical parameters of both groups of men.

Parameter \ Groups	DM1 (n=30)	Controls (n=41)	P – value
FBG (mmol/l) *mean±SD*	7,92±2,27	5,07±0,24	**0,000°**
HbA_{1C} (%) *mean±SD*	8,24±1,24	4,96±0,23	**0,000°**
ALB (g/l) *mean±SD*	43,43±2,04	44,95±2,86	0,600°
TPROT (g/l) *mean±SD*	68,72±4,08	69,96±3,85	0,188°
CREA (µmol/l) *median; IQR*	78,5;12	88;13,5	**0,004[1]**
U-ALB (ug/min) *median; IQR*	8,9;26,05	–	–

° – T-test;
[1]– Mann-Withey U test

Table 3.

Hormonal parameters in the studied groups of men.

Parameter \ (N)	DM1 (n=37)	Controls (n=41)	P – value
	Median; IQR	Median; IQR	
LH (IU/l)	4,28;2,02	4,61;1,44	0,126[1]
FSH (mIU/ml)	4,77;2,89	4,87;2,15	0,553[1]
LH/FSH	0,83;0,36	0,91;0,28	0,284[1]
E2 (pg/ml)	29,64;13,48	30,80;12,40	0,900[1]
T (mg/ml)*	5,02±1,12	4,64±0,90	0,101°
SHBG (nmol/l)	38,8;17,40	28,60;10,15	**0,000[1]**
FAI	47,82;24,09	62,64;21,28	**0,004[1]**
cFT (ng/ml)	0,091;0,04	0,097±0,03	0,465[1]
BioT (ng/ml)*	2,26±0,70	2,48±0,50	0,071
Prl (mU/l)	146,79;79,07	171,51;67,54	*0,058[1]*
TSH (mU/l)	1,79;0,87	1,82;1,18	0,688[1]
DHEA-S (µg/dl)*	269,05±76,14	283,04±72,75	0,328°
ACTH (pg/ml)*	28,95±9,30	28,44±9,57	0,854°
Cortisol 8h (nmol/l)*	438,04±107,45	406,64±105,05	0,279°

° – T-test;
[1]– Mann-Withey U test

that patients with poor glycemic control had a lower endogenous pulse rate of LH and a reduced response of LH to episodic administration of exogenous GnRH (28). The conclusion is that the lack of response stems from the immediate effects of diabetes and not from the long-term complications of the disease (since such are not present in the case).

In the present study, gonadotropin levels in men with DM1 did not differ significantly from those in healthy controls. Some authors report higher LH levels among men with DM1 compared to FSH compared to healthy controls, with the authors explaining the results with lower levels of FAI and cFT (due to normal total serum testosterone), which stimulates LH secretion. (19).

Men with DM1 in our study presented with a large waist circumference and an increased W/H ratio compared to healthy controls. BMI is one of the most commonly used in daily clinical practice for obesity screening, but it is not an indicator for distinguishing muscle from adipose tissue (29). On the other hand, the W / H ratio is used to reliably assess the redistribution of adipose tissue in the body and determine the type of obesity, and also serves as a non-invasive assessment of cardiovascular risk (30). The world literature is accumulating more and more data on the increased incidence of MS among patients with DM1 (32,33), as well as the relationship of the latter with micro- and macrovascularcomplications. (31). Despite the lack of diabetic macroangiopathy, nephropathy and proliferative retinopathy, men with DM1 in our study had an increased W/H ratio. The relationship of the indicator with glycemic con trol, the duration of the disease and TDI is the subject of future research.

In conclusion, men with DM1 had levels of sex hormones and BMI comparable to matched clinically healthy men of active reproductive age. In order to clarify the pathogenesis of the demonstrated results – higher SHBG values and lower FAI in DM1, a more in-depth assessment is needed considering glycemic control, disease duration and insulin doses.

References

1. **Cooper AJ.** Diagnosis and management of „Endocrine impotence." *Br Med J 1972;* 2:34 –36

2. **Crown A, Clifton DK, Steiner RA.** Neuropeptide signaling in the integration of metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology 2007;* 86(3): 175-182.

3. **Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, et al.** Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol 2006;* 254 –255: 127 –132.

4. **Sliwowska JH, Fergani C, Gawałek M, Skowronska B, Fichna P, Lehman MN.** Insulin: its role in the central control of reproduction. *Physiol Behav 2014;* 133: 197-206.

5. **Kumanov, F.** Endocrinology of the male reproductive system. *Academic Publishing House „Prof. Marin Drinov"; Sofia, 2013,* ISBN 978-954-322-570-5; 411 pp. (In Bulgarian) [**Куманов, Ф.** Ендокринология на мъжката репродуктивна система. *Академично издателство „Проф. Марин Дринов"; София, 2013,* ISBN 978-954-322-570-5; 411 стр.]

6. **Corona G, Monami M, Rastrelli G, Aversa A, Sforza A, Lenzi A, et al.** Type 2 diabetes mellitus and testosterone: A meta-analysis study. *Int J Androl 2011;* 34: 528-540.

7. **Corona G, Mannucci E, Forti G, Maggi M.** Hypogonadism, ED, metabolic syndrome and obesity: a pathological link supporting cardiovascular diseases. *Int J Androl 2009;* 32(6): 587-598.

8. **Maresch CC, Stute DC, Alves MG, Oliveira PF, de Kretser DM, Linn T.** Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: a systematic review. *Hum Reprod Update 2018;* 24(1): 86-110.

9. **Navarro-Casado L, Juncos-Tobarra MA, Cháfer-Rudilla M, de Onzoño LÍ, Blázquez-Cabrera JA, Miralles-García JM.** Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity. Study in rats. *J Androl 2010;* 31(6): 584-592.

10. **Ballester J, Muñoz MC, Domínguez J, Rigau T, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE.** Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. *J Androl 2004;* 25(5):706-719.

11. **Ahmed N.** Advanced glycation endproducts. Role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract 2005;* 67: 3-21;

12. **Maiorino MI, Bellastella G, Della Volpe E, Casciano O, Scappaticcio L, Cirillo P, et al.** Erectile dysfunction in young men with type 1 diabetes. *Int J Impot Res 2017;* 29(1): 17-22.

13. **Schoeller EL, Schon S, Moley KH.** The effect ot type 1 diabetes on hypothalamic, pituitary and testes axis. *Cell Tissue Res 2012;* 349(3): 839–847.

14. **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC.** Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia 1985;* 28: 412–419.

15. **Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM.** A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab 1999;* 84(10): 3666-3672.

16. **Tomar R, Dhindsa S, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R, Dandona P.** Contrasting testosterone concentrations in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care 2006;* 29(5): 1120-1122.

17. **Biswas M, Hampton D, Newcombe RG, Rees DA.** Total and free testosterone concentrations are strongly influenced by age and central obesity in men with type 1 and type 2 diabetes but correlate weakly with symptoms of androgen deficiency and diabetes-related quality of life. *Clin Endocrinol (Oxf) 2012;* 76(5): 665-673.

18. **van Dam EW, Dekker JM, Lentjes EG, Romijn FP, Smulders YM, Post WJ et al.** Steroids in adult men with type 1 diabetes: a tendency to hypogonadism. *Diabetes Care 2003; 26(6):* 1812-1818.

19. **Hylmarova S, Stechova K, Pavlinkova G, Peknicova J, Macek M, Kvapil M.** The impact of type 1 diabetes mellitus on male sexual functions and sex hormone levels. *Endocr J 2020;* 28; 67(1): 59-71.

20. **Grossmann M, Thomas MC, Panagiotopoulos S, Sharpe K, MacIsaac RJ, Clarke S, et al.** Low Testosterone Levels Are Common and Associated with Insulin Resistance in Men with Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab 2008;* 93: 1834–1840.

21. **Dhindsa S, Miller MG, McWhirter CL, Mager DE, Ghanim H, Chaudhuri A, Dandona P.** Testosterone concentrations in diabetic and nondiabetic obese men. *Diabetes Care 2010;* 33(6): 1186-1192.

22. **Osuna JA, Gómez-Pérez R, Arata-Bellabarba G, Villaroel V.** Relationship between BMI, total testosterone, sex hormone-binding-globulin, leptin, insulin and insulin resistance in obese men. *Arch Androl 2006;* 52(5): 355-361.

23. **Brand JS, van der Tweel I, Grobbee DE, Emmelot-Vonk MH, van der Schouw YT.** Testosterone, sex hormone-binding globulin and the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int J Epidemiol 2011;* 40(1): 189-207.

24. **Christensen L, Hagen C, Henriksen JE, Haug E.** Elevated levels of sex hormones and sex hormone binding globulin in male patients with insulin dependent diabetes mellitus. Effect of improved blood glucose regulation. *Dan Med Bull 1997;* 44(5): 547-550.

25. **Pasquali R, Casimirri F, De Iasio R, Mesini P, Boschi S, Chierici R, et al.** Insulin regulates testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations in adult normal weight and obese men. *J Clin Endocrinol Metab 1995;* 80(2):654-658.

26. **Boering M, van Dijk PR, Logtenberg SJ, Groenier KH, Wolffenbuttel BH, Gans RO, et al.** Effects of intraperitoneal insulin versus subcutaneous insulin administration on sex hormone-binding globulin concentrations in patients with type 1 diabetes mellitus. *Endocr Connect 2016;* 5(3):136-142.

27. **Baccetti B, La Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, De Leo V.** Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod 2002;* 17(10): 2673-2677.

28. **López-Alvarenga JC, Zariñán T, Olivares A, González-Barranco J, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A.** Poorly controlled type I diabetes mellitus in young men selectively suppresses luteinizing hormone secretory burst mass. *J Clin Endocrinol Metab 2002;* 87(12): 5507-5515.

29. **Hall DM, Cole TJ.** What use is the BMI? *Arch Dis Child 2006;* 91(4): 283-286.

30. **Ashwell M, Gibson S.** Waist to height ratio is a simple and effective obesity screening tool for cardiovascular risk factors: Analysis of data from the British National Diet And Nutrition Survey of adults aged 19-64 years. *Obes Facts 2009;* 2(2): 97-103.

31. **Lee AS, Twigg SM, Flack JR.** Metabolic syndrome in type 1 diabetes and its association with diabetes complications. *Diabet Med 2021;* 38(2): e14376.

32. **Thorn LM, Forsblom C, Fagerudd J, Thomas MC, Pettersson-Fernholm K, Saraheimo M, et al.** FinnDiane Study Group. Metabolic syndrome in type 1 diabetes: association with diabetic nephropathy and glycemic control (the FinnDiane study). *Diabetes Care 2005;* 28(8):2019-2024.

33. **Parente EB, Harjutsalo V, Forsblom C, Groop PH.** Waist-Height Ratio and the Risk of Severe Diabetic Eye Disease in Type 1 Diabetes: A 15-Year Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab 2022;* 107(2): 653-662.

Българско Дружество по Ендокринология (БДЕ)

СЪОБЩЕНИЕ

Напомняме на нашите колеги-членове на БДЕ:

❶ Да преведат по банковата сметка на БДЕ годишния си членски внос за 2020 г. – 50 лева, за 2021 г. – 50 лева и за 2022 г. или общо 150 лв.

(в членския внос е включен и годишният абонамент за сп. Ендокринология за 2020, 2021 и 2022 г.)

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).

❷ 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*

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

С това съществено се променя статутът им.

❹ 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)

Болест на Von Hippel-Lindau: Какъв клиничен фенотип определя хотспот мутацията c. 500G>A (p.Arg167Gln)?

Тодорова, Катя Н.[1], Ковачева, Катя Ст.[2], Билчева, Стела В.[1], Тоцев, Начко И.[3], Захариева, Сабина З.[4], Еленкова, Атанаска П.[4]

[1] Клиника по Ендокринология, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Медицински Университет, Плевен
[2] Катедра по Медицинска генетика, Медицински Университет, Плевен
[3] Отделение по Образна диагностика, УМБАЛ „Св. Марина“, Медицински университет, Плевен
[4] Клиника по Хипоталамо-хипофизарни, надбъбречни и гонадни заболявания, УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“, Медицински университет, София

Адрес за кореспонденция:
Доц. Катя Тодорова, д.м.,
Втора Клинична база, Клиника по Ендокринология
бул. Владимир Вазов № 91
Плевен 5800, България
e-mail: todorova_kate@abv.bg

Постъпване: 25. 05. 2022
Приемане: 06. 06. 2022

Резюме

Въведение: Болестта (или синдромът) на von Hippel – Lindau (VHL) представлява рядко генетично заболяване, дължащо се на мутация в едноименния тумор-супресорен ген, разположен върху късото рамо на хромозома 3 (3p25-26). Автозомно-доминантният тип на унаследяване определя 50% риск за поколението на носителите на герминативна мутация. Клиничната картина може да включва различни неоплазми, най-честите от които са: феохромоцитом, хемангиобластом, бъбречен карцином, невроендокринни панкреасни тумори и др. Провеждането на генетична консултация и навременна диагностика дават възможност за ранна и качествена грижа за пациентите с този неопластичен синдром.

Целта на настоящата публикация е да се представи една фамилия със синдрома на von Hippel – Lindau (VHL) и обзор по проблема с фокус върху предизвикателствата, свързани с клиничната диагностика (критерии, клинико-хормонална характеристика), генетични тестове и консултиране.

Материали и методи: Представяме три последователни поколения от засегната фамилия, постепенната изява на различни комбинации от класическите клинични характеристики на това наследствено заболяване и някои генетични особености. Данните са получени чрез проучване на наличната медицинска документация на семейството, дългогодишно наблюдение и проследяване.

Резултати: Първоначално поставената според клиничните критерии диагноза е доказана през 2007 г. чрез генетичен анализ на трите генерации (баба, майка и внук), като при бабата и майката е открита мутация в екзон 3 на VHL-гена – c. 500G>A (p.Arg167Gln).

Заключение: Изразените генотип-фенотипни корелации и съвременните образни методи за диагностика, заедно с генетичното консултиране и навременното тестване, позволяват ранно диагностициране и своевременно лечение на туморите, влизащи в състава на очаквания фенотип, при откритите родственици със синдрома на VHL.

Ключови думи: синдром на von Hippel-Lindau, феохромоцитом, хемангиобластом, генетичен анализ.

Въведение

Болестта на von Hippel-Lindau (VHL) е рядко генетично автозомно-доминантно заболяване, характеризиращо се с висока пенетрантност и вариабилна експресивност. Представлява форма на доминантно унаследяващ се фамилен неопластичен синдром, с предразположение за развитие на различни злокачествени и доброкачествени тумори. Причинява се от мутация във VHL тумор супресорен ген (1), разположен в късото рамо на 3. хромозома (3p25-26), кодиращ протеин (VHL протеин).

Нормалният белтъчен продукт на *VHL* гена има две основни изоформи и участва в регулацията на генната транскрипция, пост-транскрипционната генна експресия и в процесите на клетъчна апоптоза и убиквитиниране. Той е отговорен за нормалното функциониране на т.нар. „кислороден сензор" на клетката, регулирайки един специфичен транскрипционен фактор, хипоксия-индуцируем фактор-1 алфа (HIF-1α), който е отговорен за клетъчния отговор към хипоксия. В условията на клетъчна нормоксия VHL протеинът се свързва с други фактори (Rbx1, cullin-2, elongin B, elongin C), образувайки в цитозола т. нар. E3-лигазен комплекс (или VHL-комплекс). При нормоксия пролиновите остатъци на C- и N-терминалните участъци на HIF1α са хидроксилирани под действието на специфични пролил-хидроксилази, което ги прави „разпознаваеми" от VHL-протеина - той ги свързва и „подава" за последваща полиубиквитинация и деградация (2). Ако настъпи хипоксия, пролил-хидроксилазите се инактивират, HIF1α не се разпознава от VHL протеина, не се разгражда, а се свързва с хипоксия-индуцируем фактор-1 бета (HIF-1β) в хетеродимер. Последният се транслоцира в клетъчното ядро, изпълнявайки функцията на транскрипционен фактор за редица таргетни гени, кодиращи протеини с ключова роля в ангиогенезата, еритропоезата, глюкозния метаболизъм и транспорт. На изследователите, открили този механизъм, беше присъдена Нобеловата награда за медицина и физиология през 2019 г. (3).

Този сценарий се разиграва и при наличие на мутация във VHL-гена (4). Аберантният VHL протеин нарушава формирането на E3-лигазния комплекс и клетката получава погрешен сигнал за хипоксия (псевдохипоксия), HIF-1α не се разпознава от VHL протеина и не се разгражда (5). Натрупаният HIF-1α/HIF-1β хетеродимер стимулира продукцията на някои цитокини и растежни фактори – съдов ендотелен растежен фактор (VEGF), произхождащ от тромбоцитите растежен фактор бета (PDGFβ), трансформиращ растежен фактор алфа (TGFα) и субстанции, наподобяващи еритропоетина *(Фиг.1)* (6,7).

Сигналният път VHL/HIF има изключително важна роля в регулацията на кислородната хомеостаза и вътреклетъчния метаболизъм. Дисрегулация в този път на сигнална трансдукция поради герминативни, соматични мутации или епигенетични модификации е отключващ фактор за туморогенезата при болестта на VHL. Абнормно активираните HIF-1 и HIF-2 фактори репрограмират метаболизма на туморните клетки от анаеробна в аеробна гликолиза.

Счита се, че инактивирането и на двата алела на тумор-супресорния ген стартира туморогенезата (Knudson's two-hit hypothesis). Първият алел обикновено се инактивира чрез герминативна мутация (най-често е унаследена и е основа за фамилните форми на заболяването), а вторият алел – чрез допълнителна соматична мутация на по-късен етап (8). Инактивирането на *VHL* гена има няколко последствия, от които най-важни са загубата на тумор-супресорна способност на променения или липсващ VHL протеин, непотиснатата *ир*-регулация на HIF и повишената продукция на растежните фактори. Всички те стимулират туморния растеж, характерен за болестта на VHL (9).

Тумори в състава на болестта на von Hippel-Lindau

Феохромоцитомите са катехоламин-секретиращи тумори, установяващи се при болестта на VHL с честота между 10-20%. Характерно за тях е, че те са фамилни, по-често двустранни, бенигнени и се появяват в ранна възраст.

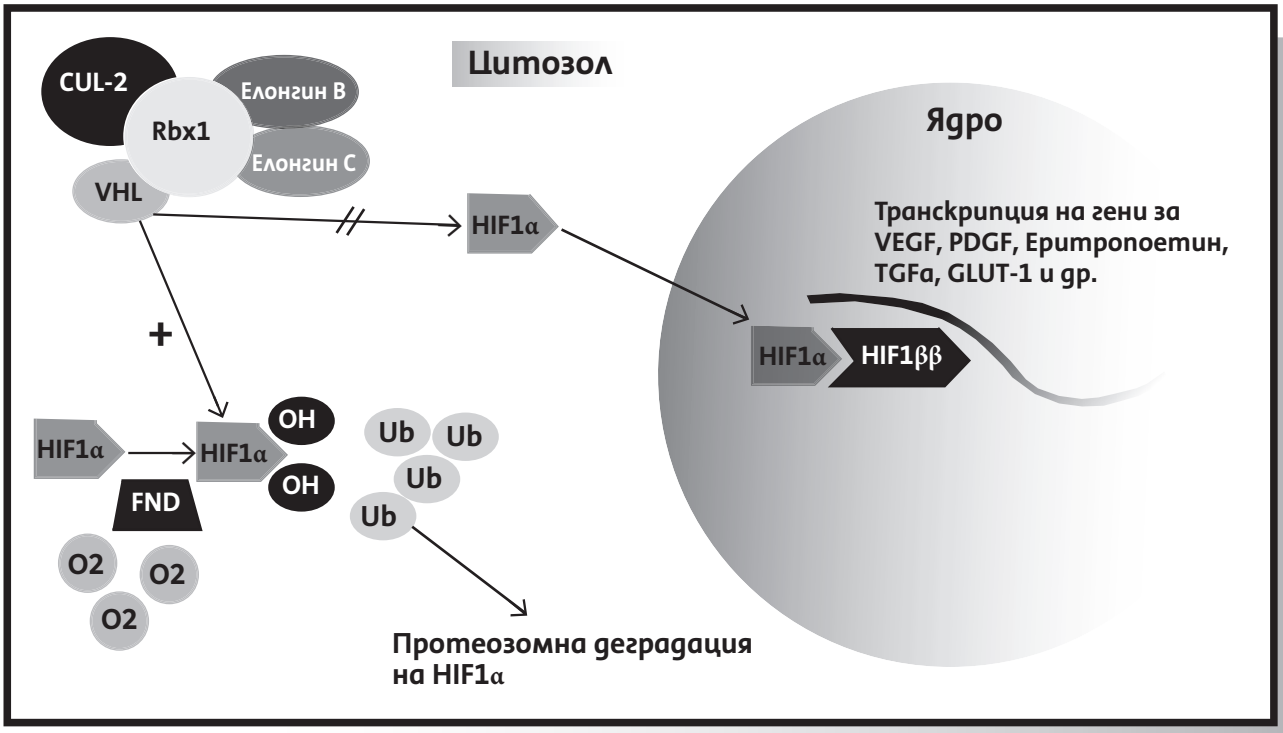
Хемангиобластомите (ХБ) са най-типичният за болестта вид тумори. По-често те са доброкачествени, изградени от новообразувани кръвоносни съдове и възникват в централната нервна система (ЦНС), най-често с локализация в малкия мозък и в гръбначните коренчета, както и в ретината. Възникват в по-млада възраст (между 12 и 20 години) и имат бърз растеж. Предполага се, че клетките, от които произхождат, са задържани в развитието си хемангиобластни прекурсорни клетки. В хода на развитието на ХБ, в по-напредналите стадии, туморните клетки могат да образуват кръвни острови и екстрамедуларна хематопоеза (10).

Кистите са следващите по честота прояви на VHL. Те се локализират в бъбреците, панкреаса и гениталния тракт.

Бъбречноклетъчен карцином (БКК) и панкреасни невроендокринни тумори (НЕТ) също са характерни за VHL.

Специфичната клинична класификация разделя лицата, страдащи от болестта VHL, на две

Фигура 1. Биологично действие на протеина на VHL



групи: пациентите, при които няма феохромоцитом, се класифицират като VHL тип 1 фенотип, а тези, които са с феохромоцитом, се класифицират като VHL тип 2 фенотип. Тип 2 фенотип на VHL се подразделя на субтипове 2A и 2B – според риска за развитие на бъбречен карцином. Тип 2A не се асоциира с бъбречен карцином, а включва феохромоцитом и ХБ на ЦНС, докато тип 2B обединява пациенти с феохромоцитом, БКК, ХБ и/или друг тумор на ЦНС. Характерно за тип 2A и тип 2B е съчетанието на феохромоцитом и ХБ на ЦНС и ретината (11). При тип 2C засегнатите пациенти развиват единствено изолирани феохромоцитоми.

Клиничната картина на синдрома се представя с едновременното наличие на поне две диагностицирани неоплазми – ХБ на ретината или на ЦНС, феохромоцитом, бъбречни кисти/карцином, панкреасни кисти/кистаденоми или НЕТ, по-рядко тумори на ендолимфатичния сак или епидидимиса при мъжете/ широката маточна връзка при жените, както и на други места в гениталния тракт (12).

Диагнозата VHL може да се постави по клинични критерии, но се потвърждава със сигурност само след молекулно-генетично изследване.

За диагностициране на VHL по клинични критерии е нужно пациентът да попадне в една от изброените три групи:

1) пациент с фамилна анамнеза за VHL и наличие на поне един от типичните за синдрома тумори (ХБ на ретината или на ЦНС, светлоклетъчен бъбречен карцином, панкреатичен НЕТ, тумори на ендолимфатичния сак);

2) два или повече ХБ в ретината или ЦНС;

3) един ХБ в ретината или в ЦНС, в съчетание с поне един от типичните за синдрома висцерални тумори (с изключение на бъбречни кисти и кисти на епидидима!) (13). Молекулно-генетичното изследване е задължително при всеки пациент с новодиагностициран ХБ на ЦНС, при новодиагностицирано заболяване с характерни за болестта на VHL прояви, засягащи очите или висцералните органи, или при положителна фамилна анамнеза за VHL-асоциирани тумори (14).

Генетичният анализ потвърждава диагнозата при доказване на хетерозиготен патологичен вариант във *VHL* гена. Най-често срещаните мутации при този фамилен синдром са missense замените (52%), следвани от ***frameshift*** мутациите (13%), nonsense замените (11%), по-редки са делециите на целия ген (10%), ***splice site*** мутациите (7%) и ***in-frame делеции/инсерциите*** (6%) (15).

Различните генетични мутации определят различни клинично-фенотипни корелации. Геномните делеции са характерни за фенотип 1, при който не се развива феохромоцитом, missense мутациите са най-често срещани при фенотип 2, при който винаги възниква феохромоцитом (16).

Настоящото изложение представя ретроспективно фамилия със засегнати от синдрома на VHL родственици (майка, дъщеря и внук) от три поколения, като сравнява установените генотип-фенотипни корелации с научната информация, публикувана по темата. Изготвено е родословно дърво, включващо и други суспектни за болестта на VHL членове на семейството. Данните са получени чрез проучване на наличната медицинска документация на семейството (след получаването на информирано съгласие от пълнолетен член) и дългогодишно наблюдение и проследяване.

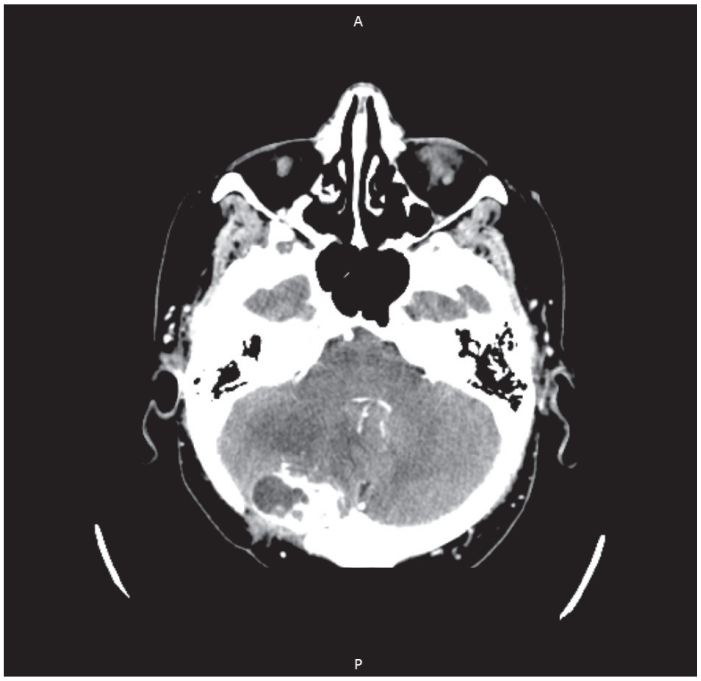
Медицинската история на наблюдаваните членове от фамилията ще бъде описана в три отделни казуса.

Клиничен случай 1: Пробандът (индексен пациент) е жена на 20 годишна възраст, която през м. февруари 1971 г. търси лекарска помощ в Офталмологична клиника в МУ, Плевен, във връзка със замъгляване зрението на двете очи. По същото време е установена бременност – прекратена по медицински показания заради риск от слепота, поради съмнение за ХБ на ретината. Влошаването на зрението прогресира, въпреки прилаганата медикаментозна терапия, и две години по-късно се налага постъпване в офталмологична клиника, където са приложени неколкократни ксенонови фотокоагулации. На базата на рано изявилите се ХБ на ретината е предположена болест на von Hippel-Lindau. През следващата година се установяват двустранна вторична субкомпенсирана глаукома и усложнена зряла катаракта на дясното око, както и отлепване на ретината на същото око. Състоянието постепенно прогресира до амавроза вдясно, а след известно време пациентката окончателно губи зрението и на лявото око.

През 1982 г. настъпва втора бременност, завършила успешно с раждане на дете от женски пол. Болестта на VHL е доказана през 2007 г. Нова изява на синдрома се документира чак през 2010 г. след КАТ с контраст. Описаната находка съответства на централна хемангиоматоза, разположена в областта на дясната малкомозъчна хемисфера. Скенира се умерено голяма овоидна формация, добре ограничена (до 40 мм), с хетероденсна интралезионна характеристика – наличие на хиперденсна солидна компонента с размери 20/22 мм и кистична хиподенсна компонента с размери 24/17 мм; изразен „mass effect“, водещ до деформация и дислокация вляво на 4-ти вентрикул, с данни за вътрешна оклузивна хидроцефалия *(Фиг. 2А и Фиг. 2Б)*. Проведена е субокципитална краниотомия с парциална туморна резекция, като близостта на ХБ до голям кръвоносен съд не е позволила тоталното отстраняване на тумора. Хистологичната диагноза е малигнен хемангиоперицитом, с втора степен на малигненост. Проведена е следоперативна лъчетерапия с обща доза 50 Грей. Остатъчната туморна тъкан е била резистентна на лъчелечението и в рамките на три години настъпва повторното ѝ разрастване. Проведената КАТ (2013 г.) доказва резидуална туморна лезия с размери, идентични с тези преди операцията, и сходна характеристика, но в структурата не се визуализира отчетливо солидната компонента *(Фиг. 3)*. Една година по-късно (2014 г.), чрез ядрено-магнитен резонанс (ЯМР) се установява обтурационна хидроцефалия, причинена от туморния рецидив *(Фиг. 4)*. Проследената лезия не е показала данни за съществен растеж в рамките на една година *(Фиг. 5)*. Препоръчано е извършване на декомпресивна оперативна интервенция, като се предлага терапия с Дексаметазон до деня на операцията. През 2016 г. е взето решение за реоперация с КиберНож. В ранния следоперативен период настъпва малигнена хипертермия, с повишаване на телесната температура до 40°С, с клинични прояви на остра сърдечна исхемия, кома и фатален изход за пациентката (на 61-годишна възраст).

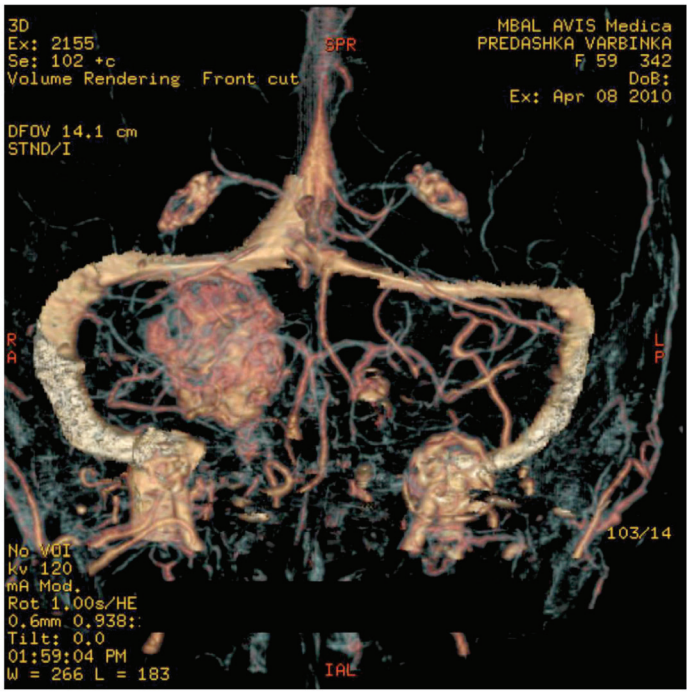
Клиничен случай 2: Този казус представя развитието на симптоматиката при дъщерята на пробанда (от Случай 1). Първите оплаквания датират от 2003 г., когато (на 21 годишна възраст) е диагностицирана ретинална лезия на ляво око, суспектна за ангиоматоза – осъществена е флуоресцеинова ангиография (ФА), която отхвърля съмнението. По-късно въпросната лезия е определена като факоматоза.

Първият доказан тумор е документиран през м. октомври 2006 г., когато след хипертонични кризи и остра задстернална болка е проведено ехографско изследване на коремните органи, което установява двустранни лезии в надбъбречните жлези. Визуализираните новообразувания са обективизирани и чрез компютър-томографско (КТ) изследване с контраст, описващо ги като двустранни мекотъканни хиперденсни нодули, с размери 51/42 мм в дясна надбъбречна жлеза и 41/24 мм в лява надбъбречна жлеза - образни характеристики, съответни на двустранен феохромоцитом. Извършена е десностранна тотална и левостранна субтотална адреналектомия. Диагнозата двустранен феохромоцитом е потвърдена с хистологично из-



Фигура 2.А

Предоперативен образ на хемангиобластом. КАТ с контраст от 08. 04. 2010 г.

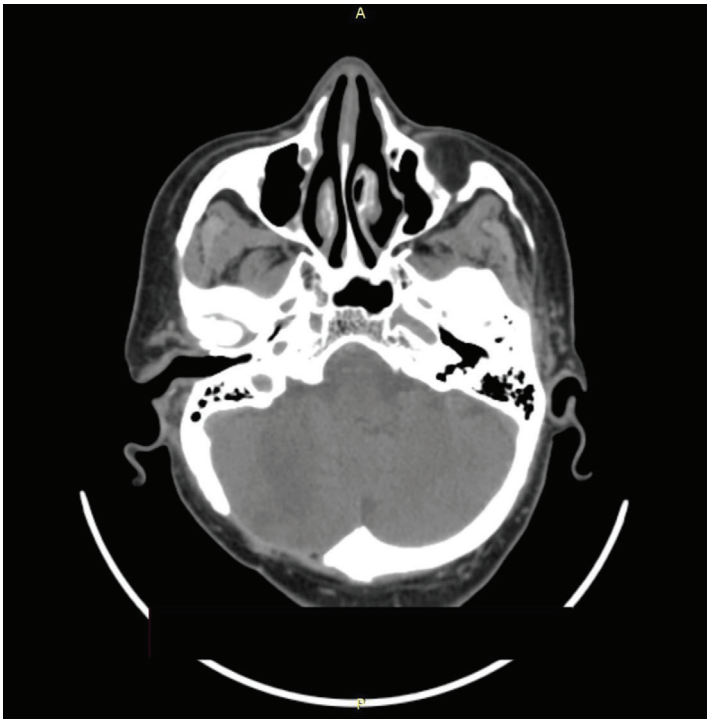


Фигура 2.Б

3D предоперативен образ на хемангиобластом. КАТ с контраст от 08. 04. 2010 г. Интрааксиално в дясна черепна ямка, в областта на дясната малкомозъчна хемисфера, парамедиално се скенира добре ограничена умерено голяма до 40мм (в аксиален план) овоидна формация. Същата е с подчертано хетероденсна интралезионална характеристика – наличие на хиперденсна солидна компонента с размери 20/22 мм и кистична хиподенсна компонента латерално с размери 24/17 мм. Изразен mass-effect, водещ до деформация и дислокация наляво на 4-ти вентрикул, с данни за вътрешна оклузивна хидроцефалия.

следване. За постоперативния хипокортицизъм е започната заместителна терапия с Преднизон 7,5 мг дневно и Флудрокортизон 50 мкг дневно, на фона на което е постигнат отличен контрол. Направеният през 2007 г. генетичен анализ в Европейска болница „Жорж Помпиду“, Париж, Франция, установява мутация в екзон 3 на VHL-гена – c. 500G>A (p.Arg167Gln) (17).

През 2007 г. се диагностицира нова проява на болестта – киста в опашката на панкреаса, която с течение на времето претърпява обратна резорбция. Пациентката износва успешна бременност и през 2009 г. ражда дете от мъжки пол. Три години по-късно, при фундоскопия, се установява наличие на ХБ, предизвикал кръвоизлив в ретината и стъкловидното тяло на дясното



Фигура 3.

Постоперативен образ на рецидив на хемангиобластом. КАТ без контраст от 13. 08. 2013г.
Находката е идентична с тази от 2010 г., но в структурата не се визуализира отчетливо солидната компонента в туморната формация.

око, по повод на което е проведена лазертерапия. В края на 2021 г. настъпва нов кръвоизлив в ретината на същото око с последваща лазерна коагулация. През 2017 г. се установява ехографски нова панкреасна киста – този път в областта на главата, която до настоящия момент не показва данни за растеж. Чрез магнитно-резонансна томография е визуализиран и микроаденом на хипофизата, уточнен като хормононесекретиращ. Последната установена лезия е хемангиом в десния дял на черния дроб с диаметър 6 мм, който също не нараства. Пациентката подлежи на активно клинично наблюдение, лабораторно-хормонален контрол и регулярно проследяване чрез визуализиращи методи.

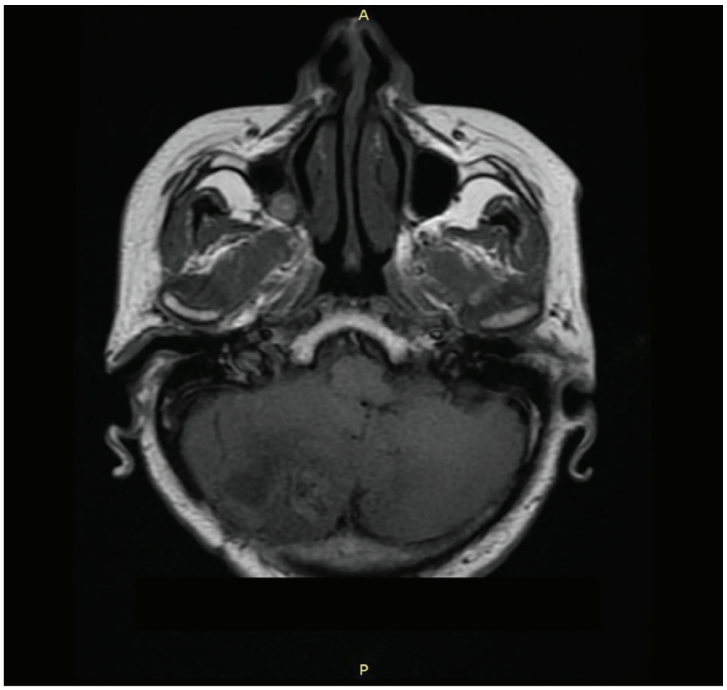
Клиничен случай 3: При сина (клинично здрав) на пациентката от Казус 2, на 1-годишна възраст се провежда генетичен анализ за търсене на мутацията, доказана при майката и бабата. Резултатът от изследването не установява мутация във гена.

Обсъждане

Болестта на VHL е открита, благодарение на независимите разработки на немския офталмолог Eugen von Hippel, който през 1904 г. за първи път описва ХБ на ретината, и шведския патолог Arvid Lindau, който през 1926 г. открива асоциация между хемангиобластомите на ЦНС и ретината. Lindau изказва хипотезата, че вероятно ХБ на ретината възникват към третия лунарен месец на бременността, тъй като дотогава ретината все още не е васкуларизирана (18). През последния век проучванията по темата продължават. Едно от тях доказва, че броят на новите изяви на годишна база не е постоянен през целия живот, а зависи от възрастта на пациентите, техния генотип и локализацията на лезиите (19).

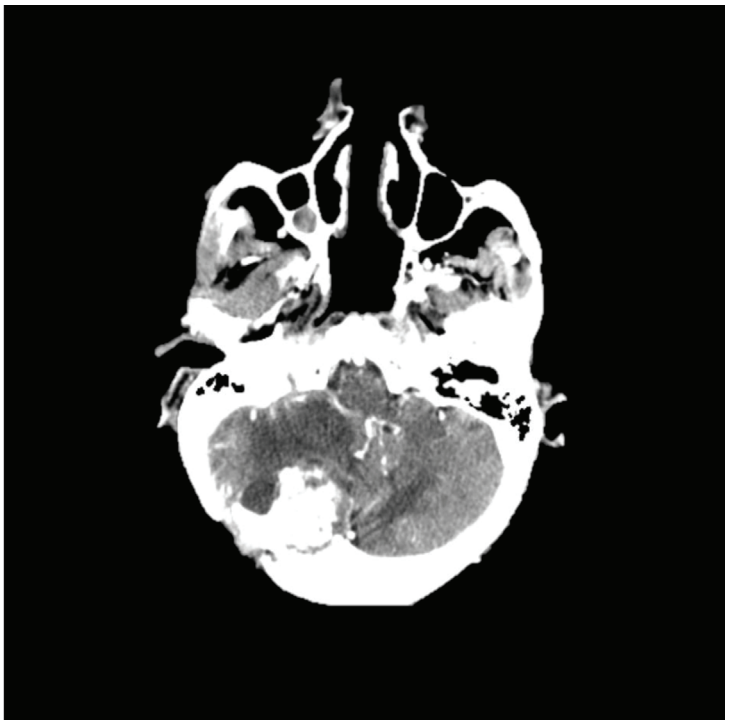
Докладваните клинични казуси при двете жени са пример за класическа изява на болестта на VHL. Началото на болестта и при двете е около 20-годишната им възраст, проявило се със сходна клинична характеристика – при майката с ретинен ХБ, а при дъщерята с очна факоматоза. На базата на специфичната клинична характеристика, болестта може да се класифицира като тип 2А фенотип. По-младата възраст и очната изява на болестта са характерни клинични особености, които предполагат носителство на missense-мутации във *VHL*. Възникналият в по-късна възраст (56 г.) малкомозъчен ХБ, е малигнен и с рецидивиращ характер. Хронологичното му развитие показва бърз темп на растеж, с данни за компресия, невъзможност за тотално отстраняване след неврохирургична интервенция и резистентност към лъчетерапията. Специфично за мозъчните ХБ при болестта на VHL е, че относително рядко са малигнени.

Възникналите при дъщерята двустранни феохромоцитоми са бенигнени. Появата на мултиплени доброкачествени феохромоцитоми е характерен белег за болестта на VHL. Типичната



Фигура 4.

Постоперативен образ на рецидив на хемангиобластом. Магнитно-резонансна томография – Нативна, от 19. 04. 2014 г. Инфратентенториално вдясно, в областта на дясна малкомозъчна хемисфера, се изобразява овоидна формация с резки, но неравни –лобулирани, очертания. В T1 и T2 премерванията в нея ексцентрично, медиално се изобразява солиден хетероинтенсен фокус с размери 24/18 мм. Латерално се визуализират течно-еквивалентни псевдокистични компоненти. Перифокално, около циркумференцията на туморната маса, се изобразява хипоинтенсна лентовидна зона – загуба на сигнала, асоциирана с наличната некомуницираща обтурационна хидроцефалия.



Фигура 5.

КАТ с контраст от 20.07.2015 г. Постоперативен образ на рецидив на хемангиобластом. Без промяна в находката от 2014 г.

хормонална констелация на феохромоцитома в рамките на синдрома на VHL би била с превали-раща норадреналинова секреция. Това е съществена разлика от хормоналната констелация, характерна за множествена ендокринна неоплазия (MEN-2), където обичайно адреналиновата секреция е доминираща. Причината за това е отпадането на стимулиращия ефект на VHL протеина върху експресията на фенилетаноламин-N-метил-трансфераза (PNMT) (ензим, осъществяващ метилирането на Норадреналин до Адреналин) (17).

Наблюдаваната рецидивираща киста на панкреаса при младата жена е асимптоматична, но подлежаща на динамично проследяване. Под наблюдение е оставен и новопоявилият се хемангиом на черния дроб. Панкреасното засягане при болестта на VHL включва кисти, кистаденоми иНЕТ, които се наблюдават при около $^{2}/_{3}$ от случаите.

Поради това, че феохромоцитомите се дължат на генетичен дефект, при фамилна анамнеза за феохромоцитом и съмнение за болестта на VHL е задължително да се извърши молекулно-генетичен анализ, първо на пробанда (индексния пациент), а при доказана мутация – и на неговите родственици от първа степен (сибси/братя,сестри и деца). При родител – носител на герминативна мутация, за болестта на VHL, за всяко едно от децата има 50% вероятност да унаследи тази мутация, а оттук и предразположението за заболяването. Генетичното изследване при двете жени (майка и дъщеря) доказва missense мутация p.Arg167Gln, водеща до изява на заболяването в две последователни поколения (16). Проведеният генетичен анализ в третата генерация (внука) не установява мутация във VHL гена, което доказва, че той не е унаследил генетичния дефект от майка си и няма риск за заболяването.

Съвременното поведение, базирано на целенасочен генетичен анализ за търсене на специфични мутации, асоциирани с болестта на VHL, доказва изключително важната роля на генетичната консултация при пациентите с наследствени заболявания. Ролята на генетичния консултант е не само за предоставяне на информация относно рисковете за предаване на мутацията и предразположението за заболяването в потомството, но и за идентифициране на тези родственици от фамилията, които имат риск да са носители на генетичния дефект. Насочването за генетичен тест на такива родственици позволява пресимптоматична (преди клинични прояви) диагностика на мутацията, активно клинично проследяване с възможност за по-ранна диагностика на туморните лезии и по-ефективното им лечение. Според данни на Nordstrom-O'Brien и сътр., и Ong и сътр. при болестта на VHL най-честите (50% от случаите) мутации са missense, като те се асоциират с 63% риск за развитие на феохромоцитом или фенотип тип 2 (15, 20).

Екип на Liu и сътр. съобщават за генотип-фенотипни корелации при болестта VHL, но въз основа на мутации в местата на свързване на HIF-α. Те потвърждават, че missense мутациите се асоциират с повишен риск от феохромоцитом. Рискът от феохромоцитом е по-нисък в групата на missense мутации в мястото на свързване на HIF-α, отколкото в групата на missense мутации в място за свързване, различно от HIF-α. Пациентите в групата на мутации в място за свързване, различно от HIF-α, имат по-висок риск от феохромоцитом и по-нисък риск от ХБ на ЦНС, БКК и тумор на панкреаса. Освен това, мутациите вмясто за свързване, различно от HIF-α, са независимо свързани с по-добра обща преживяемост и специфична за ХБ на ЦНС преживяемост (21).

Друг колектив, на Lee и съавтори, доказва, че аминокиселинните замени в мястото на свързване на HIF-α се асоциират с възрастово-зависим риск от ХБ на ЦНС. Именно той е сигнификантно по-висок при лица, носители на missense мутации в мястото за свързване на HIF-α (22). Данните от други генетични проучвания показват, че frameshift и nonsense мутации, причиняващи преждевременно спиране на белтъчния синтез, се съчетават с по-висок риск за развитие на ХБ в ЦНС, в сравнение с missense мутациите (23).

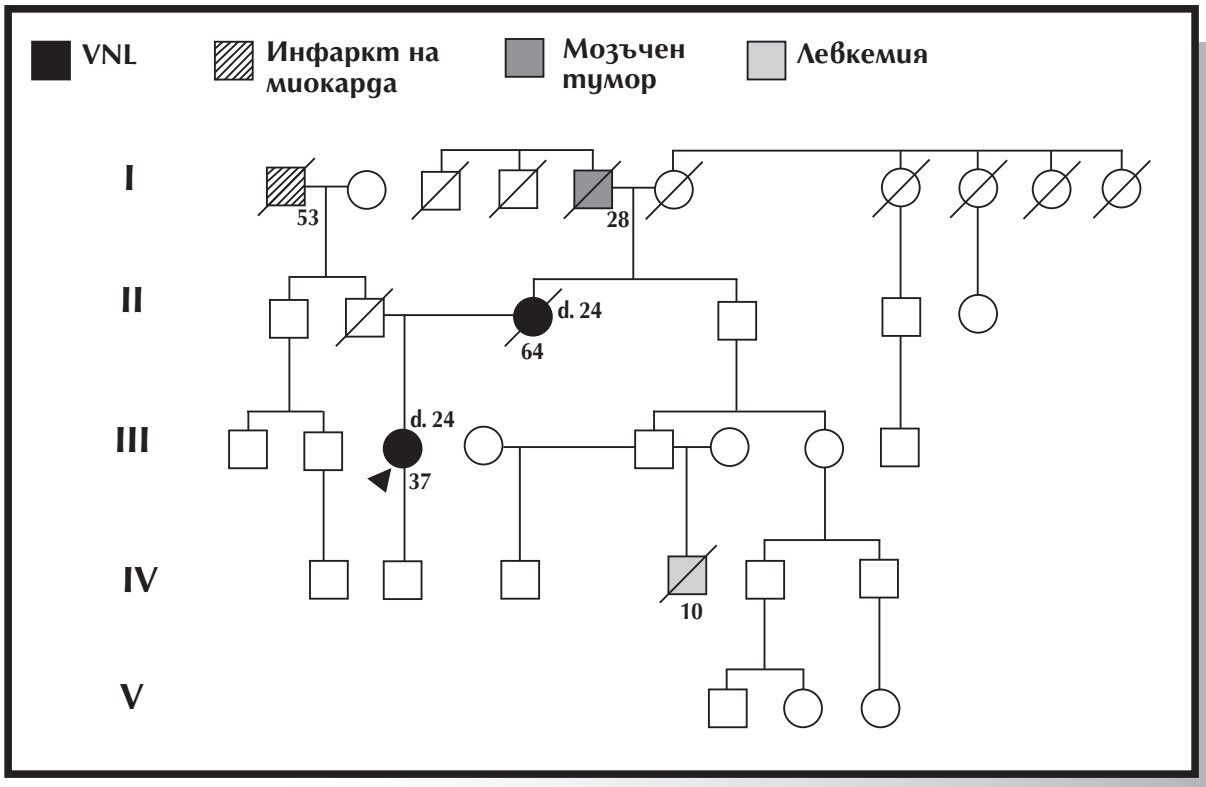
Фенотипните характеристики зависят не само от мястото на мутацията. Различни точкови мутации в един и същи кодон, но водещи до различна аминокиселинна замяна, водят до съществени разлики във фенотипната изява на заболяването (2). При нашите пациентки с клинично проявена болест на VHL, е установена мутация c.500G>A (p.Arg167Gln) в екзон 3 на VHL-гена, която е свързана със замяна на аминокиселината аргинин с глутамин в кодон 167 във VHL-протеина.

При молекулярно-генетичен анализ на малка селектирана група от български пациенти, страдащи от болестта на VHL, се установяват мутации с различна локализация в екзоните на *VHL*. Три от установените мутации попадат в екзон 3, което го прави „гореща точка" (hot spot). Най-често засегнат и описван като „hot spot" е кодон 167, мутацията в който води до замяна на аминокиселината аргинин (Arg) с глутамин (Gln). Аминокиселинната замяна променя местата за свързване на Елонгин B и C и не позволява формиране на VHL протеин – Елонгин B-C тумор-супресорен комплекс (24). Missense мутацията c.500G>A (p.Arg167Gln) се установява при 9,5% от всички семейства с болестта на VHL и в 35,3% от семей-ствата с болестта на VHL с фенотип тип 2 (25). Трябва да се подчертае, че има популационни различия в генотип-фенотипните корелации. Проучванията сред западни популации установяват предразположеност предимно към изява на ренален карцином и ренални кисти (VHL тип 1 фенотип) при тази мутация.

При тип 2A са установени и други две специфични missense-мутации – Tyr98His (т. нар. „Black Forest"-мутация) и Tyr112His, предразполагащи към развитие на феохромоцитом и ХБ, но не и бъбречен карцином (17, 26).

В 80% от случаите, мутацията, открита в пробанда, се оказва унаследена и се доказва в единия от родителите на пациента. Такава мутация често е възникнала много отдавна и се е предавала последователно от поколение на поколение, като трудно

Фигура 6. Родословно дърво на описаната фамилия



Генеалогичният анализ включва 24 родственика от пет поколения *(поколенията са означени с римски цифри)*. Пробандът е означен със стрелка.

Използвани символи:

○ – женски пол □ – мъжки пол ⊘ диагонална линия – починал родственик

Защриховани символи:

■ – VHL ▨ – инфаркт на миокарда ■ – мозъчен тумор ■ – левкемия

може да бъде проследена назад във времето (27).

Генетичният анализ на родословното дърво в такива фамилии позволява да се проследи предполагаемата генетична връзка и унаследяване от прародител. Анализът на родословното дърво на описаната от нас фамилия *(Фиг. 6)* установява: баща на пробанда – починал в млада възраст (28 г.) от внезапна сърдечна смърт (вероятно инфаркт); здрав брат на пробанда има внук, починал на 10 годишна възраст от левкемия. Няма достатъчно генеалогични данни, които да доказват наследственост при пробанда и унаследяване на заболяването/генетичния дефект от единия родител. Въпреки това, вероятността за унаследяване остава, тъй като се касае за автозомно-доминантно заболяване с 50% риск за предаване на мутантния алел в потомството. В преобладаващата част от диагностицираните случаи на болестта на VHL има данни за фамилност и един засегнат родител, и само 20% от случаите са спорадична изява, резултат от de novo настъпила мутация при лица без данни за наследственост (27).

Освен герминативната мутация в единия алел на гена, съществено условие за изява на туморогенезата при болестта на VHL е възникването на допълнителна мутация, причиняваща инактивиране и на втория нормален алел – този феномен се развива на ниво соматична клетка и е известен като „загуба на хетерозиготност" (LOH, loss of heterozygosity). LOH на тумор-супресорния VHL е доказано при ХБ на ЦНС, БКК, туморите на ендолимфатичния сак и епидидималните кистаденоми, и вероятно се отнася и за останалите тумори, свързани с VHL (28).

Ранната диагностика на туморите позволява своевременно започване на лечение и подобряване изхода от болестта. Понастоящем в

клиничната диагностика на болестта на VHL се използват позитрон-емисионната томография/компютърна томография с 68Gallium-DOTA пептид за по-бързо и щадящо целотелесно сканиране (29) и ехо-ендоскопското биопсиране на панкреатични лезии, подходящо при пациенти с бъбречна недостатъчност. Тези методи позволяват удобно сравняване на образните находки с цел своевременно установяване на динамика в растежа на туморната маса (30).

Прогнозата на болестта се определя от броя на засегнатите органи. ХБ на ЦНС са с най-съществена тежест върху оценката на дългосрочния прогностичен риск, защото възникналите в резултат на тяхната компресия неврологични увреждания са необратими и с прогресивен ход. Лечението на ХБ на ЦНС е хирургично, с минимално инвазивни неврохирургични техники като микрохирургия, невронавигация, интраоперативен невромониторинг с ендоваскуларна емболизация (31, 32). ХБ на ретината може да бъде съчетан с катаракта, глаукома, отлепване на ретината, макулна ексудация, стъкловиден кръвоизлив и загуба на зрение (33). За да се избегне такава, ХБ трябва да се лекуват своевременно. Настоящото развитие на медицината предлага множество терапевтични възможности, но лазерната коагулация се доказва като най-ефективен метод за лечение на малките тумори на периферната ретина. При по-големите тумори лечението е чрез криокоагулация или брахитерапия. Само в напреднали случаи на очна увреда се стига до резекция на туморната формация (34).

Описват се редица нови клинични изяви, като анорексия (35), паротиден мукоепидермоиден карцином (36), кожен кистаденом (37), кардиомегалия (38) и една атипична проява на болестта на VHL при мутация (Arg167Gln), която се изявява не само с двустранни феохромоцитоми, но и с карциноид на белите дробове, и НЕТ на панкреаса (39).

Всички пациенти с болестта на VHL и носителите на герминативна мутация подлежат на активно наблюдение и диагностично уточняване в съответствие с възприетата скринингова програма. При доказаните носители на мутации във VHL гена е необходимо: 1) Ежегодно да се извършва преглед на ретината чрез индиректна офталмоскопия след медикаментозна мидриаза и ултразвуково изследване на коремни органи; 2) На всеки две години да се провежда пълен физикален преглед с изследване на уринни или плазмени метанефрини и абдоминална компютърна томография с прицелност към бъбреци, панкреас и надбъбречни жлези. При патологични находки (клинико-хормонални или образни) е необходимо да се проведе ЯМР на коремни органи или радиоизотопно изследване с ^{131}I-метайодобензил гуанидин (^{131}I-MIBG) за уточняване на локализацията. Необходимо е провеждане на ЯМР на главен и гръбначен мозък и вътрешния слухов канал с контраст (gadolinium) и аудиологично изследване на всеки 2 години (40).

На профилактично проследяване подлежат всички родственици от първа степен на пациенти с VHL, като се препоръчва ежегодна оценка, с начало от едногодишна възраст, за проблеми със зрението и слуха, неврологични симптоми и проследяване на кръвното налягане. За скрининг на феохромоцитомите се използват ежегодни изследвания на плазмени метанефрини или фракционирани метанефрини в 24-часова урина, като се започне от 5-годишна възраст (41).

Към момента, все още без отговор остава въпросът дали бременността, продължителната употреба на хормонална контрацепция, на хормон-заместваща терапия или хормонална стимулация при *in vitro* фертилизация може да даде тласък на растежа на туморите в състава на синдрома или да отключи трансформацията на бенигнените варианти в малигнени при жени - хетерозиготни носителки на герминативни мутации в гена *VHL*.

Лечението на феохромоцитомите е оперативно, с повишен риск от рецидиви, дори при бенигнените варианти, в резултат на персистиращия генетичен дефект. При редките малигнени варианти дългосрочната прогноза е лоша; в допълнение към хирургията се прилага комбинирана терапия с ^{131}I-MIBG и химиотерапия с циклофосфамид, дакарбазин и винкристин, често с незадоволителен резултат. Медикаментозното лечение на артериалната хипертония включва приложение на алфа-адренорецепторни антагонисти (феноксибензамин, празозин и доксазосин), калциеви антагонисти, тирозин-хидроксилазния инхибитор метилтирозин, АСЕ-инхибитори. Бета-блокерите трябва да се добавят само след ефективна алфа-блокада, при неовладяеми тахикардии. Внимателно трябва да се прилагат и препаратите с комбинирана алфа- и бета-блокираща активност (лабеталол, карведилол) – поради доминиращата си бета-блокираща активност е препоръчително комбинирането им с ниски дози алфа-блокер.

Заложени са клинични проучвания с изпитване на медикаменти, инхибиращи специфични сигнални пътища в малигнените феохромоцитомни клетки, насочени към инхибиция на Raf-1 киназа, основен ензим на митоген активирания протеинкиназен (MAPK)-сигнален път, който регулира клетъчната пролиферация (42) и Notch-1 за блокиране на ангиогенезата при ХБ, локализирани в ЦНС (43). Тези пътища се проучват и при медуларния

тиреоиден карцином и карциноидите, и може би са таргет за обещаващи бъдещи терапии.

Разработени са инхибитори, таргетиращи VHL/HIF–сигналния път на трансдукция. Протеинкиназните инхибитори (ПКИ) потискат ангиогенезата чрез инхибиция на VEGF-сигналния път, блокирайки VEGF-лигандите или VEGF-рецепторите. До момента са разработени над 40 ПКИ, използвани в лечението на рака (Sunitinib, Cabozantinib, Danitinib и др.). Основният механизъм на действие се свежда до блокиране пролиферацията на туморните клетки, потискане на метастазите и преодоляване на терапевтичната резистентност. Резултатите от клиничните изпитвания са обнадеждаващи относно ефекта им при параганглиоми и метастатични феохромоцитоми. Най–добри резултати са наблюдавани след употребата на Pazopanib (44). В клинично проучване, обхващащо пациенти с болестта на VHL, е установено, че 13 от общо 31 пациенти (42%) достигат терапевтично-таргетирания отговор, подобен отговор е наблюдаван при 31 (52%) от 59 пациенти с БКК (45).

Селективните HIF-инхибитори са обект на задълбочени и интензивни проучвания. Дълго време се е считало, че транскрипционните молекули, свързани с хипоксия индуцируемите фактори, не могат да бъдат медикаментозно таргетирани. Сега, на базата на структурно подобие с HIF-2α, са разработени две фармакологични молекули, PT 2385 и PT 2399, насочени към инхибиране на HIF-2α, защото е наблюдавано, че HIF-2α се екпресира в по-голяма степен, отколкото HIF-1α, при мутация във *VHL*. Проведените in vitro и in vivo проучвания доказват, че инхибиторите на HIF-2α са много по-обещаващи, отколкото инхибиторите на HIF-1α при тумори, асоциирани с мутации във VHL. Belzutifan (WeliregTM) е инхибитор на HIF-2α и е одобрен от Американската агенция за контрол на храни и лекарства (FDA) през август 2021 г. Той е показан за лечение на възрастни с болестта на VHL, които се нуждаят от терапия на свързаните с нея усложнения, като ХБ на ЦНС и панкреасни НЕТ, на които не се налага спешна операция. Белзутифан се свързва с HIF-2α и възпрепятства свързването с HIF-1β, с което се потиска транскрипцията и експресията на гените от биохимичната пътека на HIF-2α (46, 47).

Изпитвани са и други терапевтични молекули, които въздействат на различни стъпала от VHL/HIF-сигналния път – 17 N alyllamino -17 N dimethoxy – geldanamycin и 17 dymethyilaminoethylamino-17 demetho xigeldanamycin. Разрабо тени са и селективни инхибитори на HIF-1α (echinomicin, bisphenol A, cryptotranshynon и др.), които са обещаващи в лечението на метастатични параганглиоми и феохромоцитоми. В процес на клинични изпитвания е и приложението на стволови клетки при тази рядка патология (48).

Заключение

Описаните клинични случаи представят три последователни поколения от фамилия, носеща мутация във *VHL*. Клиничната картина и развитие на болестта при тях съответстват на информацията, известна за синдрома до момента. Молекулно-генетичният анализ доказа носителството на герминативна мутация, асоциирана с болестта на VHL, в първа степен родственици (майка и дъщеря) от две последователни генерации и не потвърди мутацията в третото поколение (което е без риск за заболяването). Настоящата публикация представя основните предизвикателства при синдрома на VHL, свързани с навременното поставяне на клинична диагноза, доказване на генетичния дефект и значението на генеалогичния анализ за проследяване унаследяването и идентифициране на рисковите родственици.

Напредъкът на медицината позволява чрез използване потенциала на генетичните тестове (диагностични и превантивни) и генетичната консултация (за предоставяне на информация и откриване на родственици с риск за носителство на генетичния дефект) да се създадат съвременни насоки за ранна диагностика, проследяване и лечение на пациентите със заболяването VHL, което да им предостави по-добри шансове за преживяване и подобрено качество на живот.

Von Hippel-Lindau Disease: What Clinical Phenotype Does the Hotspot Mutation c. 500G>A (p.Arg167Gln) Determine?

Todorova, Katya N.[1], Bilcheva, Stela V.[1], Kovatcheva, Katya St.[2], Totsev, Natchko I.[3], Zacharieva, Sabina Z. [4], Elenkova, Atanaska P.[4]

[1]Clinic of Endocrinology, UMHAT „Dr. G. Stranski", Medical University, Pleven
[2]Department of Medical genetics, Medical University, Pleven
[3]Department of Imaging Diagnostics, UMHAT „St. Marina", Medical University, Pleven
[4]Clinic of Hypothalamic, Pituitary, Adrenal and Gonadal Diseases,
USHATE „Acad. Ivan Penchev", Medical University, Sofia

Адрес за кореспонденция:
Assoc. Prof. Katya Todorova, PhD,
Second Clinical Base, Clinic of Endocrinology
91 Vladimir Vazov boul.
Pleven 5800, Bulgaria
E-mail: todorova_kate@abv.bg

Submitted: 25. 05. 2022
Accepted: 06. 06. 2022

Abstract

Introduction: von Hippel-Lindau disease (or syndrome) is a rare genetic disorder due to a mutation in the eponymous tumor suppressor gene located on the short arm of chromosome 3 (3p25-26). The autosomal dominant type of inheritance determines a 50% risk for the offspring of germline mutation carriers. The clinical presentation may include various neoplasms, the most common of which are: pheochromocytoma, hemangioblastoma, renal carcinoma, neuroendocrine pancreatic tumors, etc. Genetic counselling and timely diagnosis enable early and quality care for patients with this neoplastic syndrome.

The aim of this publication is to present a family with von Hippel-Lindau syndrome and an overview of the problem with a focus on the challenges associated with clinical diagnosis (criteria, clinical and hormonal characteristics), genetic testing and counselling.

Materials and methods: We present three successive generations of an affected family, the gradual manifestation of different combinations of the classical clinical features of this inherited disease and some genetic features. The data were obtained by examining the available medical records of the family, long-term observation and follow-ups.

Results: The initial diagnosis in accordance with clinical criteria was confirmed in 2007 by genetic analysis of the three generations (grandmother, mother and grandson), and a mutation in exon 3 of the VHL gene, c. 500G>A (p.Arg167Gln), was found in the grandmother and mother.

Conclusion: The pronounced genotype-phenotype correlations and modern imaging methods, together with genetic counselling and timely testing, allow for early diagnosis and timely treatment of tumors associated with the expected phenotype in relatives with VHL syndrome.

Key words: von Hippel-Lindau syndrome, pheochromocytoma, hemangioblastoma, genetic analysis.

Introduction:

Von Hippel-Lindau disease (VHL) is a rare autosomal dominant genetic disorder characterized by high penetrance and variable expression. It is a form of dominantly inherited familial neoplastic syndrome with a predisposition to develop various malignant and benign tumors. It is caused by a mutation in the VHL tumor suppressor gene (1), located in the short arm of chromosome 3 (3p25-26), encoding a protein (VHL protein).

The normal protein product of the VHL gene has two major isoforms and is involved in the regulation of gene transcription, post-transcriptional gene expression and in the processes of cell apoptosis and ubiquitination. It is responsible for the normal functioning of the so-called „oxygen sensor" of the cell, regulating one specific transcription factor, hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1α), which is responsible for the cellular response to hypoxia. Under conditions of cellular normoxia, the VHL protein binds to other factors (Rbx1, cullin-2, elongin B, elongin C), forming in the cytosol the so-called E3-ligase complex (or VHL-complex). In normoxia, the proline residues of the C- and N-terminal sites of HIF1α are hydroxylated under the action of specific prolyl hydroxylases, making them „recognizable" by the VHL-protein – which binds them and „submits" them for subsequent polyubiquitination and degradation (2). If hypoxia occurs, the prolyl hydroxylases are inactivated, HIF1α is not recognized by the VHL protein, is not degraded, and binds to hypoxia-inducible factor-1 beta (HIF-1β) forming a heterodimer. The latter is translocated into the cell nucleus, serving as a transcription factor for a number of target genes encoding proteins with key roles in angiogenesis, erythropoiesis, glucose metabolism and transport. The researchers who discovered this mechanism were awarded the 2019 Nobel Prize in Medicine or Physiology (3).

This scenario also plays out in the presence of a mutation in the VHL gene (4). The aberrant VHL protein disrupts the formation of the E3-ligase complex and the cell receives a false hypoxia signal (pseudohypoxia), HIF-1α is not recognized by the VHL protein and is not degraded (5). The accumulated HIF-1α/HIF-1β heterodimer stimulates the production of some cytokines and growth factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor beta (PDGFβ), transforming growth factor alpha (TGFα), and erythropoietin-like substances *(Fig.1)*; (6,7).

The VHL/HIF signaling pathway plays a crucial role in the regulation of oxygen homeostasis and intracellular metabolism. Dysregulation in this signal transduction pathway due to germline, somatic mutations or epigenetic modifications is a triggering factor for tumorigenesis in VHL disease. Abnormally activated HIF-1 and HIF-2 factors reprogram tumor cell metabolism from anaerobic to aerobic glycolysis.

Inactivation of both alleles of the VHL tumor suppressor gene is thought to initiate tumorigenesis (Knudson's two-hit hypothesis). The first allele is usually inactivated by a germline mutation (most commonly inherited and the basis for familial forms of the disease), and the second allele by an additional somatic mutation at a later stage (8). Inactivation of the VHL gene has several consequences, the most important of which are loss of tumor-suppressor capacity of the altered or missing VHL protein, unsuppressed up-regulation of HIF, and increased production of growth factors. All of these stimulate the tumor growth characteristic of VHL disease (9).

Tumors in the composition of von Hippel-Lindau disease

Pheochromocytomas are catecholamine-secreting tumors found in VHL disease with an incidence between 10-20%. They are characteristically familial, more often bilateral, benign, and occur at an early age.

Haemangioblastomas (HBs) are the most typical type of tumors for this disease. They are mostly benign, composed of newly formed blood vessels and arise in the central nervous system (CNS), most often with localization in the cerebellum and spinal cord, as well as in the retina. They arise at a younger age (between 12 and 20 years) and have rapid growth. The cells from which they originate are presumed to be developmentally arrested hemangioblastic precursor cells. In the course of HBs development, in more advanced stages, tumor cells may form blood islands and extramedullary hematopoiesis (10).

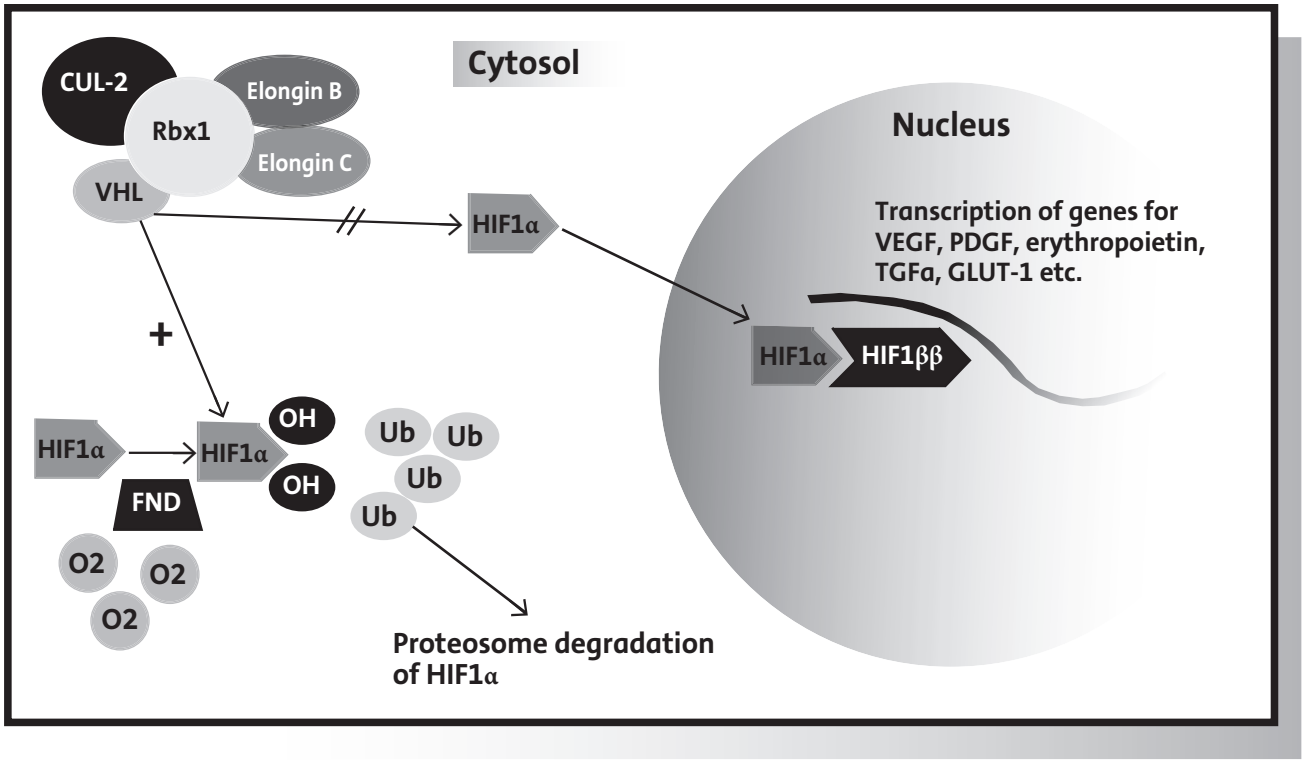
Cysts are the next most common manifestation of VHL. They are localized in the kidneys, pancreas and genital tract.

Renal cell carcinoma (RCC) and pancreatic neuroendocrine tumors (NET) are also characteristic of VHL.

The specific clinical classification divides individuals with VHL into two groups: patients who do not have pheochromocytoma are classified as VHL type 1 phenotype, and those who develop a pheochromocytoma are classified as VHL type 2 phenotype. The type 2 phenotype of VHL is subdivided into 2A and 2B subtypes according to the risk of developing renal cell carcinoma. The 2A type is not associated with renal cell carcinoma, but includes pheochromocytoma and CNS HBs, whereas type 2B unites patients with pheochromocytoma, RCC, HBs and/or other CNS tumor. The combination of pheochromocytoma and CNS and retinal HBs (11) is characteristic of types 2A and type 2B. In type 2C, affected patients develop only isolated pheochromocytomas.

The clinical presentation of the syndrome is associated with the simultaneous presence of at least two diagnosed neoplasms – retinal or CNS HBs, pheochromocytoma, renal cysts/carcinomas, pancreatic cysts/cystadenomas or NETs, less commonly tumors of the endolymphatic sac or epididymis in men/broad uterine lig-

Figure 1. Biological action of the VHL protein



ament in women, and elsewhere in the genital tract (12).

The diagnosis of VHL can be made by clinical criteria, but is only confirmed with certainty after molecular genetic testing. To diagnose VHL by clinical criteria, the patient must fall into one of the three groups listed:

1) a patient with a family history of VHL and the presence of at least one of the tumors typical of the syndrome (retinal or CNS HB, clear cell renal cell carcinoma, pancreatic NET, endolymphatic sac tumors);

2) two or more retinal or CNS HBs;

3) one retinal or CNS HB in association with at least one of the typical of the syndrome visceral tumors (excluding renal and epididymal cysts!) (13). Molecular genetic testing is mandatory in any patient with newly diagnosed CNS HB, newly diagnosed disease with typical VHL disease manifestations involving the eyes or visceral organs, or a positive family history of VHL-associated tumors (14).

Genetic analysis confirms the diagnosis when a heterozygous pathologic variant in the VHL gene is demonstrated. The most common mutations in this familial syndrome are missense substitutions (52%), followed by frameshift mutations (13%), nonsense substitutions (11%), and less common are whole gene deletions (10%), splice site mutations (7%), and in-frame deletions/insertions (6%) (15).

Different genetic mutations define different genotype-phenotype correlations. Genomic deletions are characteristic of phenotype 1, in which no pheochromocytoma develops; missense mutations are most common in phenotype 2, in which a pheochromocytoma always occurs (16).

Clinical cases

This paper retrospectively presents a family with relatives affected by VHL syndrome (mother, daughter and grandson) from three generations, comparing the genotype-phenotype correlations found with the scientific information published on the subject. A family tree including other family members with a possible VHL disease was also prepared. Data were obtained by examining the available family medical records (after obtaining informed consent from an adult member) and long-term observation and follow-up.

The medical history of the family members observed will be described in three separate case studies.

Clinical case 1: The proband (index patient) was a 20-year-old woman who sought medical attention at the Ophthalmology Clinic at MU, Pleven in February 1971, in connection with blurred vision in both eyes. At the same time a pregnancy was established – later terminated on medical grounds because of the risk of blindness due to a suspected retinal HB. The deterioration of vision progressed, despite the medical therapy administered, and two years later admission to an ophthalmology clinic was required, where multiple xenon

photocoagulations were applied. Von Hippel-Lindau disease was presumed on the basis of the early manifestations of retinal HBs. In the following year, bilateral secondary subcompensated glaucoma and complicated mature cataract of the right eye, as well as retinal detachment of the same eye, were found. The condition gradually progressed to amaurosis in the right eye, and after some time the patient finally lost vision in the left eye as well.

In 1982, a second pregnancy occurred, resulting in the successful birth of a female child. VHL disease was genetically confirmed in 2007. A new manifestation of the syndrome was documented only in 2010 after a contrast-enhanced CT scan. The finding described corresponded to central hemangiomatosis located in the right cerebellar hemisphere. A moderately large ovoid formation was scanned – well circumscribed (up to 40 mm), with heterogeneous intralesional characteristics: the presence of a hyperdense solid component measuring 20/22mm and a cystic hypodense component measuring 24/17mm; a pronounced „mass effect" leading to deformity and dislocation to the left of the 4th ventricle, with evidence of internal occlusive hydrocephalus (*Fig. 2A* and *Fig. 2B*). A suboccipital craniotomy with partial tumor resection was performed, and the proximity of the HB to a large blood vessel prevented total tumor removal. The histological diagnosis was malignant hemangiopericytoma, with grade 2 malignancy. Postoperative radiotherapy was performed with a total dose of 50 Gray. The residual tumor tissue was resistant to the radiotherapy and regrowth occurred within three years. A CT scan (2013) demonstrated a residual tumor lesion with dimensions identical to those before surgery and similar characteristics, but the solid component was not clearly visible in the structure (*Fig. 3*). One year later (2014), magnetic resonance imaging (MRI) revealed occlusive hydrocephalus caused by the tumor recurrence (*Fig. 4*). The traced lesion showed no evidence of significant growth within one year (*Fig. 5*). Decompressive surgery was recommended, and Dexamethasone therapy was suggested until the day of surgery. In 2016, the decision was made to reoperate with a CyberKnife. In the early postoperative period, malignant hyperthermia occurred, with an increase in body temperature up to 40°C, with clinical manifestations of acute cardiac ischemia, coma, and a fatal outcome for the patient (61 years of age at the time).

Clinical Case 2: This case study presents the evolution of symptoms in the daughter of the proband (from case 1). The first complaints date back to 2003 when (at the age of 21 years) a retinal lesion was diagnosed in the left eye, suggestive of angiomatosis – a fluorescein angiography (FA) was performed, which rejected the suspicion. The lesion in question was later determined to be phakomatosis.

The first proven tumor was documented in October 2006, when, following hypertensive crises and acute retrosternal chest pain, an abdominal ultrasonography was performed, which revealed bilateral adrenal lesions. The visualized neoplasms were also objectified by contrast-enhanced computed tomography (CT), describing them as bilateral soft tissue hyperdense nodules, measuring 51/42mm in the right adrenal gland and 41/24mm in the left adrenal gland, with imaging features consistent with bilateral pheochromocytomas. Right total and left subtotal adrenalectomy was performed. The diagnosis of bilateral pheochromocytomas was confirmed by the histological examination. For postoperative hypocorticism, replacement therapy with Prednisone 7,5 mg daily and Fludrocortisone 50 mcg daily was initiated and excellent control was achieved. Genetic analysis performed in 2007 at the „Georges Pompidou" European Hospital (HEGP), Paris, France, revealed a mutation in exon 3 of the VHL gene, c. 500G>A (p.Arg167Gln) (17).

In 2007, a new manifestation of the disease was diagnosed – a cyst in the tail of the pancreas, which over time underwent reverse resorption. The patient had a successful pregnancy and gave birth to a male child in 2009. Three years later, fundoscopy revealed the presence of a HB causing retinal and vitreous haemorrhage in the right eye, for which laser therapy was performed. At the end of 2021, another retinal haemorrhage occurred in the same eye with subsequent laser coagulation. In 2017, a new pancreatic cyst was detected by an ultrasound scan, this time in the head region, which has shown no evidence of growth to date. A pituitary microadenoma, specified as hormone non-secreting, was also visualized on MRI. The last lesion identified was a 6 mm diameter hemangioma in the right lobe of the liver, which also did not grow over time. The patient is under active clinical observation, laboratory and hormonal monitoring and regular follow-up by imaging modalities.

Clinical Case 3: The son (clinically healthy) of the patient in Case 2, at the age of 1 year, underwent genetic analysis in search of the mutation found in the mother and grandmother. The test did not detect a mutation in the VHL gene.

Discussion:

VHL disease was discovered thanks to the independent work of German ophthalmologist Eugen von Hippel, who first described retinal HBs in 1904, and Swedish pathologist Arvid Lindau, who in 1926 discovered an association between CNS and retinal hemangioblastomas. Lindau hypothesized that retinal HBs probably arise by the third lunar month of gestation, as the retina is not yet vascularized by then (18). Over the last century, research on the topic has continued. One of the studies proved that the number of new manifestations per year is not constant throughout life, but depends on the age of the patients, their genotype and the localization of the lesions (19).

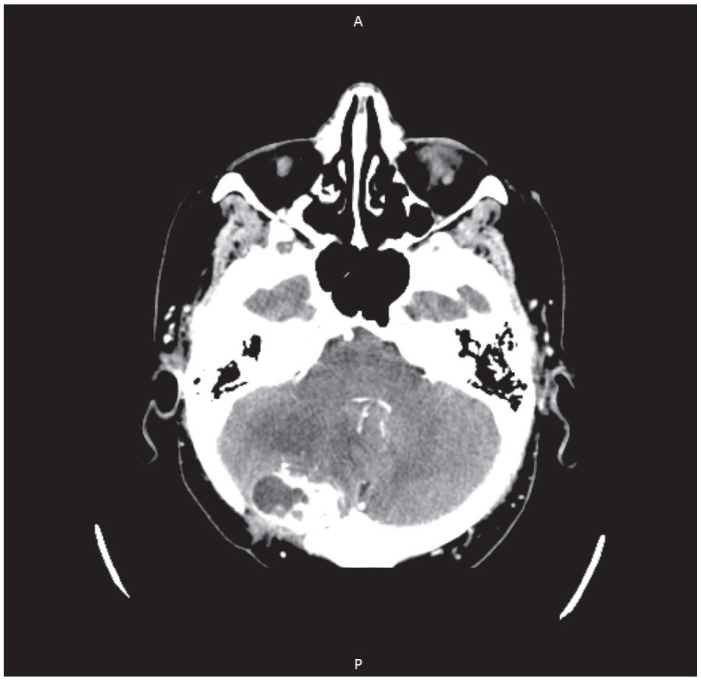


Figure 2.A

Preoperative image of hemangioblastoma. Contrast-enhanced CT - 08/04/2010.

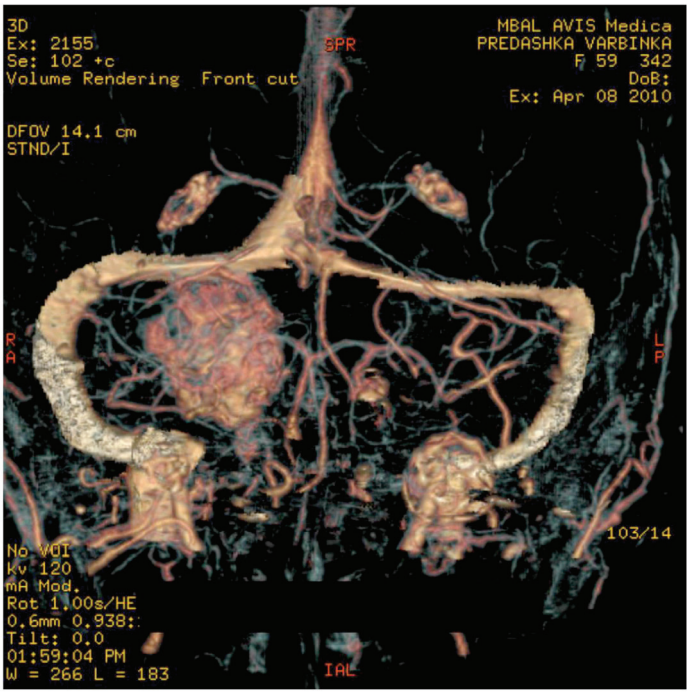


Figure 2.B

3D preoperative image of hemangioblastoma. Contrast-enhanced CT - 08/04/2010.
Intra-axially in the right cranial fossa, in the region of the right cerebellar hemisphere, a well circumscribed moderately large to 40mm (axial) ovoid formation is scanned paramedially. The latter has a markedly heterogeneous intralesional characteristic – the presence of a hyperdense solid component measuring 20/22mm and a cystic hypodense component laterally measuring 24/17mm. Pronounced mass-effect leading to deformity and dislocation to the left of the 4th ventricle, with evidence of internal occlusive hydrocephalus.

The clinical cases of the two women reported are examples of classic manifestation of VHL disease. The onset of the disease in both of them was around the age of 20 years, manifested with similar clinical characteristics - the mother with a retinal HB and the daughter with ocular phakomatosis. Based on the specific clinical characteristics, the disease can be classified as a type 2A phenotype. Younger age and ocular manifestation of the disease are characteristic clinical features that suggest the carriage of missense mutations in VHL. The cerebellar HB, which occurred at a later age (56 years), was malignant and relapsing. Its chronologic evolution shows a rapid growth rate, with evidence of compression, inability of total removal after neurosurgical intervention, and resistance to radiotherapy. A specific feature of cerebellar HBs in VHL disease is that they rarely are malignant.

The bilateral pheochromocytomas in the daugh-

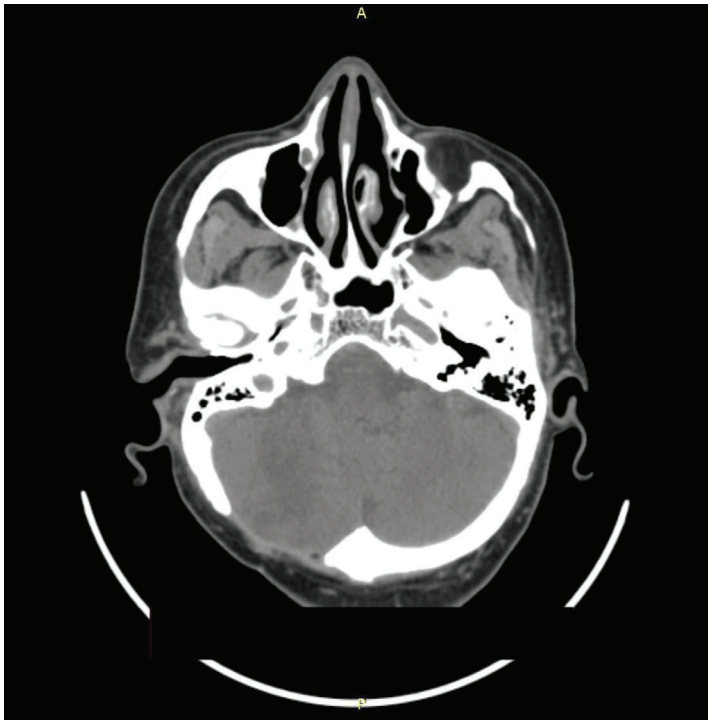


Figure 3.

Postoperative image of hemangioblastoma recurrence. CT - 13/08/2013.
The finding is identical to that of 2010, but the solid component of the tumor formation is not clearly visible in the structure.

ter were benign. The appearance of multiple benign pheochromocytomas is a characteristic feature of VHL disease. Typical hormonal constellation of the pheochromocytoma within VHL disease would be one of predominant noradrenaline secretion. This is a significant difference from the hormonal constellation characteristic of multiple endocrine neoplasia (MEN-2), where adrenal secretion is usually predominant. The reason for this is the abrogation of the stimulatory effect of the VHL protein on the expression of phenylethanolamine-N-methyltransferase (PNMT) (an enzyme involved in the methylation of Noradrenaline to Adrenaline) (17).

The recurrent pancreatic cyst observed in the young woman was asymptomatic but it required a dynamic follow-up. The new-onset hemangioma of the liver also remained under observation. Pancreatic involvement in VHL disease includes cysts, cystadenomas, and NETs, which are observed in about 2/3 of cases.

Because pheochromocytomas are due to a genetic defect, in cases of a family history of pheochromocytoma and suspicion of VHL disease, it is mandatory to perform a molecular genetic analysis, firstly on the proband (index patient), and in case of a proven mutation, also on his first-degree relatives (siblings and children). In the case of a parent carrying a germline mutation for VHL disease, each of the children has a 50% probability of inheriting this mutation and hence the predisposition for the disease. Genetic testing in both females (mother and daughter) demonstrated a missense mutation – p.Arg167Gln leading to disease expression in two consecutive generations (16). Genetic analysis performed in the third generation (grandson) did not detect the mutation in the VHL gene, proving that he did not inherit the genetic defect from his mother and is not at risk for the disease.

Current management based on targeted genetic analysis in search of specific mutations associated with VHL disease demonstrates the critical role of genetic counselling in patients with inherited diseases. The role of the genetic counsellor is not only to provide information on the risks of transmission of the mutation and the predisposition for the disease in the offspring, but also to identify those relatives in the family who are at risk of carrying the genetic defect. Referral for genetic testing of such relatives allows presymptomatic (before clinical manifestations) diagnosis of the mutation, active clinical follow-up with the possibility of earlier diagnosis of tumor lesions and more effective treatment. According to Nordstrom-O'Brien et al. and Ong et al. in VHL disease, missense mutations are the most common (50% of cases) and are associated with a 63% risk of developing pheochromocytoma or type 2 phenotype (15, 20).

A team of Liu et al. reported genotype-phenotype correlations in VHL disease, but based on mutations in HIF-α binding sites. They confirmed that missense mutations are associated with an increased risk of pheochromocytoma. The risk of pheochromocytoma was lower in the group of missense mutations in the HIF-α binding site than in the group of missense mutations in a binding site other than for HIF-α. Patients in the group of mutations in a binding site other than for HIF-α had a higher risk of pheochromocytoma and a lower riskof CNS HBs, RCC, and pancreatic tumor. Furthermore, mutations in a binding site other than for HIF-α were in-

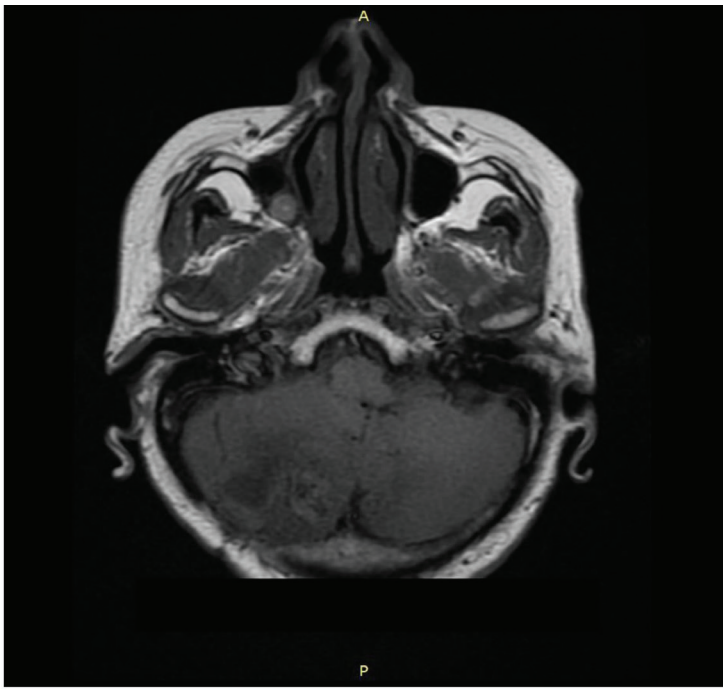


Figure 4.

Postoperative image of recurrence of hemangioblastoma. Magnetic resonance imaging - Native, 19/04/2014.
Infratentorial on the right, in the area of the right cerebellar hemisphere, an ovoid formation with sharp, but irregular – lobulated, outlines is visualized. In T1 and T2 measurements, eccentrically, medially a solid heterointense focus measuring 24/18 mm is depicted. Laterally, fluid-equivalent pseudocystic components are visualized. Perifocally, around the circumference of the tumor mass, a hypointense band-like area is depicted – a loss of signal associated with the present noncommissural occlusive hydrocephalus.

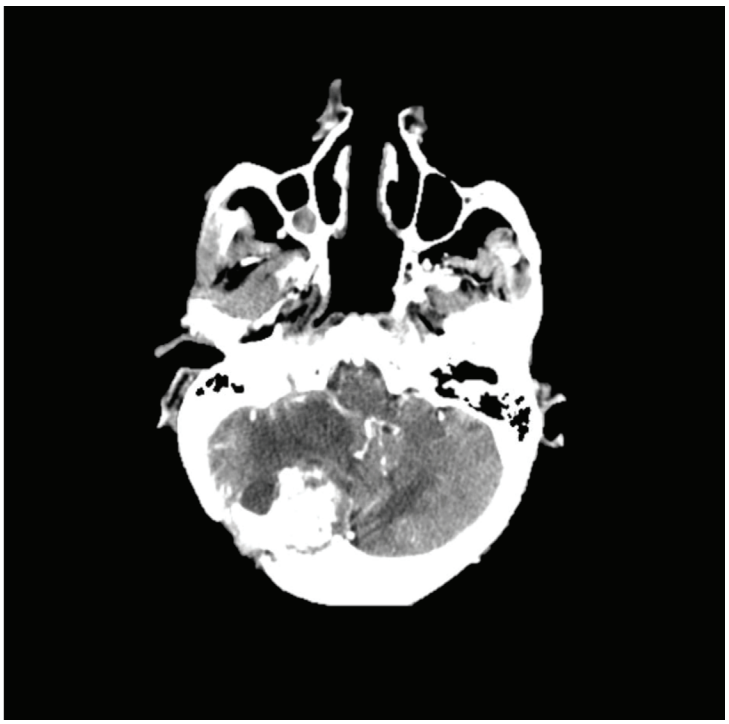


Figure 5.

Contrast-enhanced CT - 20/07/2015. Postoperative image of recurrence of hemangioblastoma. No change in the findings from 2014.

dependently associated with better overall survival and CNS HB-specific survival.

Another team, by Lee et al, demonstrated that amino acid substitutions in the HIF-α binding site are associated with an age-dependent risk of CNS HBs. It was significantly higher in individuals carrying missense mutations in the HIF-α binding site (22). Evidence from other genetic studies has shown that frameshift and nonsense mutations causing premature arrest of protein synthesis are associated with a higher risk of developing CNS HBs compared to missense mutations (23).

Phenotypic characteristics depend not only on the site of mutation. Different point mutations in the same codon, but leading to different amino acid substitutions, lead to significant differences in the phenotypic expression of the disease (2). In our patients with clinically manifested VHL disease, the c.500G>A mutation (p.Arg167Gln) in exon 3 of the VHL gene was found to

be associated with a substitution of the amino acid arginine for glutamine at codon 167 of the VHL protein.

Molecular genetic analysis of a small selected group of Bulgarian patients with VHL disease revealed mutations with different localization in the VHL exons. Three of the identified mutations fall in exon 3, making it a hot spot. The most commonly affected and described as a hot spot is codon 167, the mutation in which results in the amino acid arginine (Arg) being replaced by glutamine (Gln). The amino acid substitution alters the Elongin B and C binding sites and prevents the formation of the VHL protein-Elongin B-C tumor-suppressor complex (24). The missense mutation c.500G>A (p.Arg167Gln) is found in 9,5% of all families with VHL disease and in 35,3% of families with VHL disease with a type 2 phenotype (25). It should be emphasized that there are population differences in genotype-phenotype correlations. Studies in Western populations have found a predilection predominantly for the expression of renal cell carcinoma and renal cysts (VHL type 1 phenotype) with this mutation.

In type 2A, two other specific missense mutations, Tyr98His (the so-called „Black Forest" mutation) and Tyr112His, have been found to predispose to the development of pheochromocytoma and HBs but not renal carcinoma (17, 26).

In 80% of cases, the mutation in the proband is found to be inherited and is proven in one of the patient's parents. Such a mutation has often arisen long ago and has been passed down sequentially from generation to generation, and it is difficult to trace back in time (27).

Genetic analysis of the family tree in such families allows the presumed genetic relationship and inheritance from an ancestor to be traced. Analysis of the family tree of the family we described *(Fig. 6)* reveals: the proband's father died at a young age (28 yr) of sudden cardiac death (probably a heart attack); the proband's healthy brother had a grandson who died at 10 yr of leukemia. There is insufficient genealogical data to prove heritability in the proband and inheritance of the disease/genetic defect from one parent. However, the likelihood of inheritance remains as this is an autosomal dominant disease with a 50% risk of passing the mutant allele to the offspring. In the vast majority of diagnosed cases of VHL disease, there is evidence of familiality and a single affected parent, and only 20% of cases are sporadic resulting from a de novo mutation occurring in individuals without evidence of inheritance (27).

In addition to the germline mutation in one allele of the gene, an essential condition for the expression of tumorigenesis in VHL disease is the occurrence of an additional mutation causing inactivation of the second normal allele, a phenomenon that develops at somatic cell level and is known as loss of heterozygosity (LOH). LOH of tumor-suppressor VHL has been demonstrated in CNS HBs, RCC, endolymphatic sac tumors, and epididymal cystadenomas, and likely applies to other VHL-related tumors as well (28).

Early diagnosis of tumors allows timely initiation of treatment and improves the outcome of the disease. Current methods in the clinical diagnosis of VHL disease are positron emission tomography/computed tomography with 68Gallium-DOTA peptide for faster and more sparing whole-body scanning (29) and echo-endoscopic biopsy of pancreatic lesions, suitable for patients with renal failure. These methods allow convenient comparison of imaging findings for the timely detection of dynamics in tumor mass growth (30).

The prognosis of the disease is determined by the number of organs affected. CNS HBs have the most significant impact on long-term prognostic risk assessment because the neurological damage resulting from their compression is irreversible and progressive. Treatment of CNS HBs is surgical, with minimally invasive neurosurgical techniques such as microsurgery, neuronavigation, and intraoperative neuromonitoring with endovascular embolization (31, 32). A retinal HB can be associated with cataract, glaucoma, retinal detachment, macular exudation, vitreous haemorrhage and vision loss (33). To avoid the latter, HBs should be treated promptly. Current development of medicine offers multiple therapeutic options, but laser coagulation is proving to be the most effective method for the treatment of small peripheral retinal tumors. For larger tumors, treatment is by cryocoagulation or brachytherapy. Only in advanced cases of ocular damage is resection of the tumor formation performed (34).

A few new clinical manifestations have been described, such as anorexia (35), parotid mucoepidermoid carcinoma (36), cutaneous cystadenoma (37), cardiomegaly (38), and an atypical manifestation of VHL disease in a mutation (Arg167Gln) that presents not only with bilateral pheochromocytomas, but also with lung carcinoids, and pancreatic NETs (39).

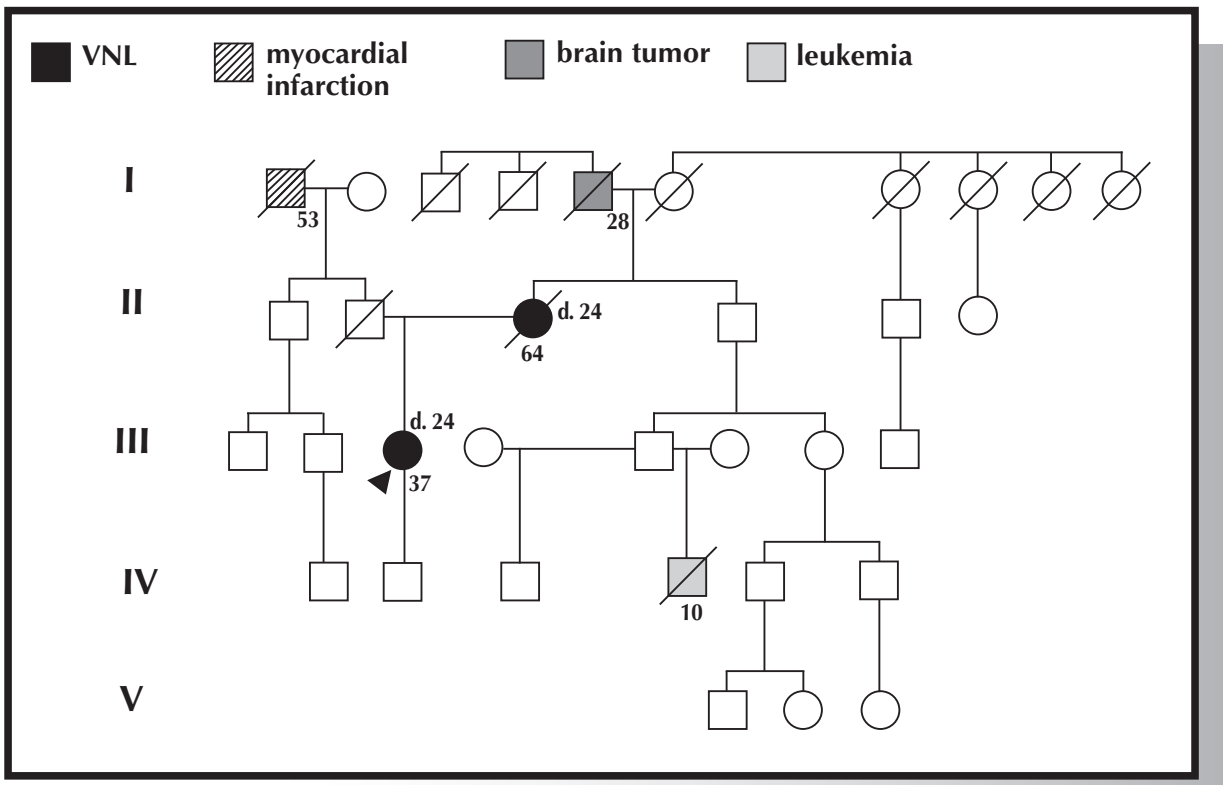
All patients with VHL disease and germline mutation carriers should undergo active surveillance and diagnostic refinement according to the accepted screening program. In proven carriers of mutations in the VHL gene, it is necessary to:

1) Annually examine the retina by indirect ophthalmoscopy after pharmacological mydriasis and abdominal ultrasound examination

2) Every two years, a complete physical examination with urine or plasma metanephrine testing and abdominal computed tomography with targeting of the kidneys, pancreas, and adrenal glands should be performed. In case of pathological findings (clinico-hormonal or imaging), abdominal MRI or radioisotope study with 131I-metaiodobenzyl guanidine (131I-MIBG) shouldbe performed to clarify the localization. Contrast-enhanced MRI of the brain, spinal cord and internal auditory canal (with gadolinium) and audiological examination every 2 years is necessary (40).

All first-degree relatives of patients with VHL aresubject to preventive follow-up, and annual evaluation,

Figure 6. Family tree of the described family



The genealogical analysis includes 24 relatives of five generations *(generations are indicated by Roman numerals)*. The proband is indicated by an arrow.

Symbols used:

– female sex – male sex diagonal line - deceased relative

Shaded symbols:

– VHL – myocardial infarction – brain tumor – leukemia

beginning at one year of age, for visual and hearing problems, neurological symptoms, and blood pressure monitoring is recommended. For screening of pheochromocytomas, annual blood tests for plasma metanephrines or fractionated 24h-urinary metanephrines are used, starting at 5 years of age (41).

At present, the question remains unanswered whether pregnancy, prolonged use of hormonal contraception, hormone replacement therapy, or hormonal stimulation in IVF-procedures can boost the growth of the tumors comprising the syndrome or trigger the transformation of benign to malignant variants in female heterozygous carriers of germline mutations in the VHL gene.

Treatment of pheochromocytomas is surgical, with an increased risk of recurrence, even in benign variants, as a result of the persistent genetic defect. In the rare malignant variants, the long-term prognosis is poor; in addition to surgery, combination therapy with ^{131}I-MIBG and chemotherapy with cyclophosphamide, dacarbazine, and vincristine is used, often with an unsatisfactory outcome. Drug treatment of arterial hypertension includes the administration of alpha-adrenoreceptor antagonists (phenoxybenzamine, prazosin, and doxazosin), calcium antagonists, the tyrosine hydroxylase inhibitor methyltyrosine, and ACE inhibitors. Beta-blockers should be added only after effective alpha-blockade, in uncontrollable tachycardias. Preparations with combined alpha- and beta-blocking activity (labetalol, carvedilol) should also be used with caution – due to their predominant beta-blocking activity, combining them with low doses of alpha-blocker is advisable.

Clinical trials testing drugs inhibiting specific signaling pathways in malignant pheochromocytoma cells have been designed to inhibit Raf-1 kinase, a key enzyme of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-signaling pathway that regulates cell proliferation (42), and Notch-1 to block angiogenesis in CNS-localized

HBs (43). These pathways are also being explored in medullary thyroid carcinomas and carcinoids, and may be targets for promising future therapies.

Inhibitors targeting the VHL/HIF signal transduction pathway have been developed. Protein kinase inhibitors (PKIs) suppress angiogenesis by inhibiting the VEGF-signaling pathway by blocking VEGF ligands or VEGF receptors. So far, more than 40 PCIs have been developed and used in cancer treatment (Sunitinib, Cabozantinib, Danitinib, etc.). The main mechanism of action is to block tumor cell proliferation, suppress metastasis and overcome therapeutic resistance. Results from clinical trials are encouraging regarding their effect in paragangliomas and metastatic pheochromocytomas. The best results have been observed after the use of Pazopanib (44). In a clinical trial involving patients with VHL disease, 13 of 31 patients (42%) were found to achieve a therapeutic-targeted response; a similar response was observed in 31 (52%) of 59 patients with RCC (45).

Selective HIF inhibitors are the subject of extensive and intensive research. For a long time, it was thought that transcription molecules associated with hypoxia-inducible factors could not be medically targeted. Now, based on structural similarity to HIF-2α, two pharmacological molecules, PT 2385 and PT 2399, have been developed to target HIF-2α inhibition because HIF-2α has been observed to be expressed to a greater extent than HIF-1α when mutated in VHL. In vitro and in vivo studies have demonstrated that HIF-2α inhibitors are much more promising than HIF-1α inhibitors in tumors associated with mutations in VHL. Belzutifan (WeliregTM) is an inhibitor of HIF-2α and was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in August 2021. It is indicated for the treatment of adults with VHL disease who require therapy for associated complications, such as CNS HBs and pancreatic NETs, who do not require emergency surgery. Belzutifan binds to HIF-2α and inhibits binding to HIF-1β, thereby suppressing transcription and expression of genes in the HIF-2α biochemical pathway (46, 47).

Other therapeutic molecules that act at different steps of the VHL/HIF signaling pathway have been tested: 17 N alyllamino-17 N dimethoxy - geldanamycin and 17 dymethylaminoethylamino-17 demethoxigeldanamycin. Selective inhibitors of HIF-1α (echinomycin, bisphenol A, cryptotranshynon, etc.) have also been developed and show promise in the treatment of metastatic paragangliomas and pheochromocytomas. The use of stem cells in this rare pathology is also under clinical trials (48).

Conclusion:

The clinical cases described represent three consecutive generations of a family carrying a mutation in VHL. The clinical presentation and disease evolution in these cases are consistent with the information known about t he syndrome to date. Molecular genetic analysis proved the carriage of the germline mutation associated with VHL disease in first-degree relatives (mother and daughter) of two consecutive generations and did not confirm the mutation in the third generation (which is without disease risk). This publication presents the main challenges in VHL syndrome related to timely clinical diagnosis, proof of the genetic defect, and the importance of genealogical analysis to trace inheritance and identify at-risk relatives.

Advances in medicine have made it possible, by harnessing the potential of genetic testing (diagnostic and preventive) and genetic counselling (to provide information and identify relatives at risk of carrying the genetic defect), to establish modern guidelines for the early diagnosis, follow-up and treatment of patients with VHL, giving them a better chance of survival and an improved quality of life.

References

1. **Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh Fat, Orcutt ML, et al.** Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science 1993;* 260: 1317-1320.

2. **Samanta D, Prabhakar NR, Semenza GL.** Systems biology of oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 2017;* 9 (4).

3. https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2019/press-release/

4. **Jochmanova I, Zelinka T, Widimsky JJ, Pacak K.** HIF signaling pathway in pheochromocytoma and other neuroendocrine tumors. *Physiol Res 2014;* 63(Suppl 2): S251-62.

5. **Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, et al.** Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature 2002;* 417(6892): 975–988.

6. **Kroll SL, Paulding WR, Schnell PO, Barton MC, Conaway JW Conaway RC, et al.** von Hippel-Lindau Protein Induces Hypoxia-regulated Arrest of Tyrosine Hydroxylase Transcript Elongation in Pheochromocytoma Cells. *The J Biol Chem 1999;* 274 (42) 30109 –30114.

7. **Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al.** Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation". *Science 2001;* 292 (5516): 468–472.

8. **Maher ER, Iselius L, Yates JR, Littler M, Benjamin C, Harris R, et al.** Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *J Med Genet 1991;* 28(7): 443-447.

9. **Mikhail MI, Singh AK.** Von Hippel Lindau Syndrome. *In Stat Pearls Publishing; 2022;* (2) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459242/

10. **Gläsker S, Li J, Xia JB, Okamoto H, Zeng W, Lonser RR, et al.** Hemangioblastomas share protein expression with embryonal hemangioblast progenitor cell. *Cancer Res 2006;* 66: 4167–4172.

11. **Lonser R, Glenn G, Walther M, Chew E, Libutti S, Linehan W et al.** Von Hippel-Lindau disease. *Lancet 2003;* 361: 2059–2067.

12. **Cassol C, Mete O.** Endocrine manifestations of von Hippel–Lindau disease. *Arch Pathol Lab Med 2015;*139: 263–268.

13. **Nielsen SM, Rhodes L, Blanco I, et al.** Von Hippel-Lindau disease: genetics and tole of genetic counseling in a multiple neoplasia syndrome. *J Clin Oncol 2016;* 34(18): 2172–2181.

14. **Crespigio J, Berbel L, Dias M, Berbel R, Pereira S, Pignatelli D, et al.** Von Hippel–Lindau disease: a single gene, several hereditary tumors. *J Endocrinol Invest 2018;* 41(1): 21-31.

15. **Nordstrom-O'Brien M, van der Luijt RB, van Rooijen E, van den Ouweland AM, Majoor-Krakauer DF, Lolkema MP, et al.** Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat 2010;* 31(5): 521-537.

16. **Elenkova A.** Pheochromocytoma: current approaches and future trends. *Science Endocrinology 2010;* 2: 118-127 (in Bulgarian) [**Еленкова А.** Феохормоцитом: съвременни подходи и бъдещи менденции. *Наука Ендокринология 2010;* 2: 118–127].

17. **Elenkova A, Jeunemaitre H, Gimenez-Roqueplo AP, Hristozov K, Zaharieva S.** Genotype-phenotype correlations in familial forms of pheochromocytoma. *Endocrinology 2010; XV; 3* :132-140 (in Bulgarian) [**Еленкова А, Jeunemaitre X, Gimenez-Roqueplo AP, Христозов К, Захариева С.** Генотипно-фенотипни корелации при фамилни форми на феохромоцитом. *Ендокринология 2010;* XV; 3:132-140].

18. **Huntoon K, Oldfield E, Lonser R.** Dr. Arvid Lindau and discovery of von Hippel-Lindau disease. *J Neurosurg 2015;* 123:1093–1097.

19. **Binderup M, Budtz-Jørgensen E, Bisgaard M.** Risk of new tumors in von Hippel–Lindau patients depends on age and genotype. *Genet Med 2016;* 18 (1): 89-97.

20. **Ong KR, Woodward ER, Killick P, Lim C, Macdonald F, Maher ER.** Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat 2007;* 28(2): 143-149.

21. **Liu SJ, Wang JY, Peng SH, Li T, Ning XH, Hong BA, et al.** Genotype and phenotype correlation in von Hippel-Lindau disease based on alteration of the HIF-alpha binding site in VHL protein. *Genet Med 2018;* 20(10): 1266–1273.

22. **Lee JS, Lee JH, Lee KE, Kim JH, Hong JM, Ra E K, et al.** Genotype–phenotype analysis of von Hippel–Lindau syndrome in Korean families: HIF-alpha binding site missense mutations elevate age-specific risk for CNS hemangioblastoma. *BMC Med Genet 2016;* 17: 48.

23. **Maher ER, Neumann HP, Richard S.** von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet 2011;* 19: 617–623.

24. **Glushkova M, Dimova P, Yordanova I, Todorov T, Tourtourikov I, Mitev V, et al.** Molecular-genetic diagnostics of von Hippel-Lindau syndrome (VHL) in Bulgaria: first complex mutation event in the VHL gene. *Int J Neurosci 2018;* 128 (2); 117–124.

25. **Gläsker S, Neumann HPH, Koch CA, Vortmeyer A.** Von Hippel-Lindau Disease. In: **Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al.** *Endotext 2018. https:*//www. ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279124/

26. **Brauch H, Kishida T, Glavac D, Chen F, Pausch F, Höfler H, et al.** Von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. *Hum Genet 1995;* 95: 551-556.

27. **Richards FM, Payne SJ, Zbar B, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Maher ER.** Molecular analysis of de novo germline mutations in the von Hippel-Lindau disease gene. *Hum. Mol. Genet 1995;* 4: 2139–2143.

28. **Glasker S, Sohn TS, Okamoto H, Li J, Lonser RR, Oldfield EH, et al.** Second hit deletion size in von Hippel-Lindau disease. *Ann Neurol 2006;* 59: 105–110.

29. **Shell J, Tirosha A, Milloa C, Sadowski S, Assadipoure Y, Green P, et al.** The utility of 68Gallium-DOTATATE PET/CT in the detection of von Hippel Lindau disease associated tumors. *Eur J Radiol 2019;* 112: 130-135.

30. **Keutgen X, Hammel P, Choyke P, Libutti S, Jonasch E, Kebebew E.** Evaluation and management of pancreatic lesions in pa-tients with von Hippel–Lindau disease. *Nat Rev Clin Oncol 2016;* 13 (9): 537-549.

31. **Klingler JH, Gläsker S, Bausch B, Urbach H, Krauss T, Jilg CA, et al.** Hemangioblastoma and von Hippel-Lindau disease: genetic background, spectrum of disease, and neurosurgical treatment. *Childs Nerv Syst 2020;* 36(10): 2537-2552.

32. **Byun J, Yoo H, Kim J, Kim Y, Cho Y, Hong S, et al.** Growth rate and fate of untreated hemangioblastomas: clinical assessment of the experience of a single institution. *J Neurooncol 2019;* 144(1):147-154.

33. **Binderup M, Stendell AS, Galanakis M, Moller H, Kiilgaard J, Bisgaard M.** Retinal hemangioblastoma: prevalence, incidence and frequency of underlying von Hippel-Lindau disease. *Br J Ophthalmol 2018;* 102: 942–947.

34. **Krivosic V, Kamami-Levy C, Jacob J, Richard S, Tadayoni R, Gaudric A.** Laser photocoagulation for peripheral retinal capillary hemangioblastoma in von Hippel-Lindau disease. *Ophthalmol Retina 2017;* 1 (1): 59-67.

35. **Marques J, Batista R, De Moraes M, Morais B, Pinto F, Almeida M, et al.** Anorexia as the first clinical manifestation of von Hippel-Lindau syndrome. *Mol Clin Oncol 2020;* 13(5): 65.

36. **Berger M, Kerr D, Filho A, Sargi Z.** Case of parotid mucoepidermoid carcinoma: Expanding the spectrum of von Hippel-Lindau–related neoplasms. *Head Neck 2017;* 39(3): 51-54.

37. **Wang J, Cao W, Wang Z, Zhu H.** Novel gene mutation in von Hippel-Lindau disease – a report of two cases. *BMC Medical Genetics 2019;* 20:194.

38. **Joybari A, Azadeh P.** Von Hippel-Lindau disease with multi-organ involvement: A case report and 8-year clinical course with follow-up. *Am J Case Rep, 2017;* 18: 1220-1224.

39. **Tong D, Zhang Y, Jiang J, Bi G.** Identification of a VHL gene mutation in atypical Von Hippel-Lindau syndrome: genotype-phenotype correlation and gene therapy perspective. *Cancer Cell Int 2021;* 21(1) :685-690.

40. **The VHL Family Alliance and its medical advisors;** *VHL Handbook; 2005.* https://www.vhl.org/wpcontent/uploads/ 2017/ 06/VHL-Handbook-5.pdf.

41. **Eisenhofer G, Timmers HJ, Lenders JW, Bornstein SR, Tiebel O, Mannelli M, et al.** Age at diagnosis of pheochromocytoma differs according to catecholamine phenotype and tumor location. *J Clin Endocrinol Metab 2011;* 96: 375–384.

42. **Hill B, De Melo J, Yan J, Kapoor A, He L, Cutz JC, et al.** Common reduction of the Raf kinase inhibitory protein in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget 2014;* 5(17): 7406-7419.

43. **Merrill MJ, Edwards NA, Lonser RR.** Notch receptor and effector expression in von Hippel-Lindau disease-associated central nervous system hemangioblastomas. *J Neurosurg 2011;*115(3): 512-517.

44. **Jonasch E, McCutcheon I, Gombos D, Ahrar K, Perrier N, Liu D et al.** Pazopanib in patients with von Hippel-Lindau disease: a single-arm, single-centre, phase 2 trial. *Lancet Oncol 2018;* 19 (10): 1351-1359.

45. **Gulani AC, Roy H.** Von Hippel-Lindau Disease. *Medscape 2021;* https://emedicine.medscape.com/article/1219430).

46. **Ratcliffe PJ.** HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest 2007;* 117(4): 862-865.

47. **FDA FDA** approves Welireg for von Hippel-Lindau disease-associated cancers. https://www.healio.com/news/hematology-oncology/20210813/fda-approves-welireg-for-von-hippellindau-disease-associated-cancers

48. **Scriba LD, Bornstein SR, Santambrogio A, Mueller G Huebner A, Hauer J, et al.** Cancer Stem Cells in Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Front Endocrinol 2020* https://doi.org/10.3389/ fendo.2020.00079

Българско Дружество по Ендокринология (БДЕ)

СЪОБЩЕНИЕ

Напомняме на нашите колеги-членове на БДЕ:

❶ Да преведат по банковата сметка на БДЕ годишния си членски внос за 2020 г. – 50 лева, за 2021 г. – 50 лева и за 2022 г. или общо 150 лв.

(в членския внос е включен и годишният абонамент за сп. Ендокринология за 2020, 2021 и 2022 г.)

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).

❷ 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*

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

С това съществено се променя статутът им.

❹ 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)

Национален симпозиум по ендокринология

Ендокринни проблеми на бременността

Endocrine Problems in Pregnancy

2022

Българско дружество по ендокринология

6-9 Октомври 2022, Гранд хотел, Пловдив

National Symposium of Endocrinology

6 -9 October 2022, Grand Hotel , Plovdiv

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 of partial translation into Bulgarian, provided by the Editorial board.

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

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

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

Титулна страница

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

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

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

Резюме

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

Основен текст

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

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

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

Title page

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

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

c. Address of the corresponding author name, postal address (business of 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.

Таблици 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/ PMC 3142758/). Всички автори се отбелязват с фамилно име, последвано от инициалите. При повече от шест автори, след шестия се поставя et al. Следва цялото заглавие на цитираната статия (с главна буква е само началната дума), название на списанието изписано съкратено според Index Medicus, година, том, брой на книжката в малки скоби (незадължителен при издания с непрекъснато

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

References

The references should be presented on a separate page at the end of the manuscript. It is recommended that the number of references should not exceed 25 titles for original research articles and 40 titles for the reviews. It is advisable that sources on the topic from the recent five years be used. The references are listed in their order of first appearance in the text. They should follow the Vancouver format and the Uniform requirements (http:// www.ncbi. nlm. nih.gov/pmc/ articles/ PMC 3142758/). 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 abreviated 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 off 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 Vl, Gocheva N, Petkova M, Zacharieva S, Tankova Tz, Orbetzova M, et al.** A consensus of the Bulgaran 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 оргиналните 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 Vl, Gocheva N, Petkova M, Zacharieva S, Tankova Tz, Orbetzova M, et al.** A consensus of the Bulgaran Institute Metabolic Syndrome on the metabolic syndrome. Nauka Endocrinologia. 2010; 2: 53-70 (in Bulgarian) (Христов Вл, Гочева Н, Петкова М, Захариева С, Орбецова М и съавт. Консенсус на Българския институт „Метаболитен синдром" за поведение при метаболитен синдром. *Наука Ендокринология 2010*; 2: 53-70).

Глава (раздел) от книга:

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

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

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

References to a book chapter:

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

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

Address for sending the manuscripts and other editorial correspondence

Editorial Board Address for Correspondence:

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

Адрес на редакционната колегия:

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

ISSN 1310-8131

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ
ENDOCRINOLOGIA

Списание
на Българското дружество
по ендокринология
към СНМД в България

Journal
of the Bulgarian Society
of Endocrinology (BSE)

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 Scientiic and technical Information,** *Otava*
- **ВИНИТИ/РАН-МИННАУКЕ РОССИИ,** *Москва*
- **ДЕРЖАВНА НАУКОВА МЕДИЧНА БИБЛИОТЕКА,** *Киев*

Списание „Ендокринология“ се индексира в следните база-данни/the journal „Endocrinologia“ is indexeded by:
- **SCOPUS Elsevier Bibliographic Databases** ***(2001-2017)***
- **EMBASE**
- **Bulgarian Citation Index** ***(since 1996)***
- **EBSCO** ***(since 2019)***

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