



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

# Ендокринология

## Endocrinologia

Българско дружество по ендокринология

- Изопростаните като маркери на оксидативен стрес  
*Isoprostanes as Oxidative Stress Markers*
- Клъстерна класификация на захарен диабет  
*Cluster Classification of Diabetes Mellitus*
- Парадокс на obezитета при диабетно стъпало  
*Obesity Paradox in Diabetic Foot Disease*
- Влияе ли гликемичният контрол върху показателите на хипоталамо-хипофизо-гонадна ос при жени със захарен диабет тип 1  
*Does Glycemic Control Affect Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Women with Type 1 Diabetes Mellitus*
- Ниски нива на серумен тестостерон при пациенти с остър коронарен синдром и асоциацията им със сърдечно-съдови рискови фактори  
*Incidence of Low Testosterone Levels in Patients with Acute Coronary Syndrome and its Association with Cardiovascular Risk Factors*

2/2023

Bulgarian Society of Endocrinology



# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

Списанието се индексира от/The journal is indexed by:

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

## Editorial Board/Редакционна колегия и съвет

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

**Главен редактор:** Мария ОРБЕЦОВА

**Анелия Томова/Aneliya Tomova**

**Анна-Мария Борисова/**

Anna-Maria Borissova

**Атанаска Еленкова/Atanaska Elenkova**

**Георги Кирилов/Georgi Kirilov**

**Живка Бонева /Zhivka Boneva**

**Здравко Каменов/Zdravko Kamenov**

**Иван Цинликов/Ivan Tzinlikov**

**Калинка Коприварова/Kalinka Koprivarova**

**Катя Тодорова/Katia Todorova**

**Кирил Христов/ Kiril Hristozov**

**Лидия Коева/Lidia Koeva**

**Малина Петкова/Malina Petkova**

**Митко Митков/Mitko Mitkov**

**Михаил Боянов/Mihail Boyanov**

**Нарцис Калева/Nartsis Kaleva**

**Пламен Попиванов/Plamen Popivanov**

**Радка Савова/Radka Savova**

**Русанка Ковачева/Roussanka Kovatcheva**

**Сабина Захариева/Sabina Zacharieva**

**Филип Куманов/Philip Kumanov**

**Цветалина Танкова/Tsvetalina Tankova**

## International Scientific Board/Международен научен съвет

**M. Nordio (Rome)/М. Нордио (Рим)**

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

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

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

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

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

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

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

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

**Съдържание****Обзори**

- **Томов, Десислав Г., Троев, Димитър М., Митева, Мария Ж., Орбецова, Мария М.**  
Изопростаните като маркери на оксидативен стрес 71

---

- **Бечева, Елена А., Илиев, Димитър А., Станчев, Павел Е., Орбецова, Мария М.**  
Клъстерна класификация на захарен диабет 81

**Оригинални статии**

- **Гатев, Цветан Вл., Бялкова, Виктория В., Каменов, Здравко А.**  
Парадокс на обезитетата при диабетно стъпало 88

---

- **Илиева-Герова, Мария И., Орбецова, Мария М., Райчева, Ралица Д., Денева, Тая И.**  
Влияе ли гликемичният контрол върху показателите на хипоталамо-хипофизо-гоналната ос при жени със захарен диабет тип 1 103

---

- **Шишков, Сави Р., Христов, Кирил Х., Ангелов, Атанас А., Славчева, Светослава Е., Бочева, Яна Д., Бояджиева, Мила Б.**  
Ниски нива на серумен тестостерон при пациенти с остър коронарен синдром и асоциацията им със сърдечно-съдови рискови фактори 120

*Journal* **Endocrinologia** volume XXVIII, number 2/2023

**Contents****Reviews**

- **Tomov, Desislav G., Troev, Dimitar M., Miteva, Maria Zh., Orbetzova, Maria M.**  
Isoprostanes as Oxidative Stress Markers 71

---

- **Becheva, Elena A., Iliev, Dimitar A., Stanchev, Pavel E., Orbetzova, Maria M.**  
Cluster Classification of Diabetes Mellitus 81

**Original articles**

- **Gatev, Tsvetan V., Byalkova, Viktoriya V., Kamenov, Zdravko A.**  
Obesity Paradox in Diabetic Foot Disease 95

---

- **Ilieva-Gerova, Maria I., Orbetzova, Maria M., Raycheva, Ralitsa D., Deneva, Tanya I.**  
Does Glycemic Control Affect Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Women with Type 1 Diabetes Mellitus 111

---

- **Shishkov, Savi R., Hristozov, Kiril H., Angelov, Atanas A., Slavcheva, Svetoslava E., Bocheva, Yana D., Boyadzhieva, Mila B.**  
Incidence of Low Testosterone Levels in Patients with Acute Coronary Syndrome and its Association with Cardiovascular Risk Factors 127



## Изопростаните като маркери на оксидативен стрес

Томов, Десислав Г.<sup>1</sup>, Троев, Димитър М.<sup>2</sup>, Митева, Мария Ж.<sup>2</sup>, Орбецова, Мария М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Катедра по Биоорганична химия, Фармацевтичен факултет,

<sup>2</sup>Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“,

Катедра по ендокринология, Медицински факултет,

Медицински университет, Пловдив

Постъпване: 01. 07. 2023 / Ревизиране: 05. 07. 2023/

Приемане: 08. 07. 2023

## Isoprostanes as Oxidative Stress Markers

Tomov, Desislav G.<sup>1</sup>, Troev, Dimitar M.<sup>2</sup>, Miteva, Maria Zh.<sup>2</sup>, Orbetzova, Maria M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Bioorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy,

<sup>2</sup> Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, „Sv. Georgy“, University Hospital

Department of Endocrinology, Faculty of Medicine,

Medical University, Plovdiv

Submitted: 01. 07. 2023 / Revised: 05. 07. 2023 /

Accepted: 08. 07. 2023

### Резюме

Свободните радикали представляват силно реактивни форми, които могат да съществуват самостоятелно само за сравнително кратки интервали от време, но ефектите, които оказват върху различните биомолекули, се свързват с почти всички заболявания в човешкия организъм. Основна причина за повишена заболеваемост са дегенеративните заболявания, а патогенетичните механизми на клетъчната увреда, независимо че са много различни, включват участието на оксидативния стрес. Директният анализ на нивата на свободните радикали в организма е трудно изпълним, но определянето на продуктите от действието им върху биологичните молекули е достъпна възможност за доказване наличието на оксидативен стрес в организма.

Изопростаните са основен продукт на липидната пероксидация в резултат на действието на свободните радикали. Те са стабилни съединения, които се намират във всички течности в организма и могат да дават информация за наличието на оксидативен стрес. От съществуващите към момента методи за анализ на изо-

### Abstract

Free radicals represent highly reactive forms that can exist independently only for relatively short intervals of time, but the effects they exert on various biomolecules are associated with almost all diseases in the human organism. Degenerative diseases are a major cause of increased morbidity, and the pathogenetic mechanisms of cell damage, although very different, include the involvement of oxidative stress. Direct analysis of the levels of free radicals in the body is difficult to perform, but the determination of the products of their action on biological molecules is an available possibility to prove the presence of oxidative stress in the body.

Isoprostanes are the major product of lipid peroxidation as a result of the action of free radicals. They are stable compounds that are found in all fluids in the body and can provide information about the presence of oxidative stress. Of the currently existing methods for analysis of isoprostanes, the enzyme-immunochemical ones are the most widely employed. Of the chromatographic methods,

простани най-широко са разпространени ензимно-имунохимичните. От хроматографските методи най-често се използват газ-хроматографските с предварителна дериватизация. Броят на публикуваните до момента течено-хроматографски методи е ограничен и при повечето от тях се използват високочувствителни анализатори като QTRAP, QTOF или инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация (FTIR). Това предоставя възможност за разработване и валидиране на нови течено-хроматографски методи за анализ на 8-isoPGF2- $\alpha$  в различни биологични матрици, които да бъдат предложени за диагностика в ежедневната практика.

#### Ключови думи:

свободни радикали, оксидативен стрес, изопростани, ензимно-имунохимични методи, течено-хроматографски методи

the gaschromatographic ones with preliminary derivatization are most often used. The number of liquid chromatographic methods published so far is limited and most of them use highly sensitive analyzers such as QTRAP, QTOF or Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR). This provides an opportunity to develop and validate new liquid chromatographic methods for the analysis of 8-isoPGF2- $\alpha$  in various biological matrices to be proposed for diagnostics in everyday practice.

#### Key words:

free radicals, oxidative stress, isoprostanes, enzyme-immunochemical methods, liquid-chromatographic methods

#### Въведение

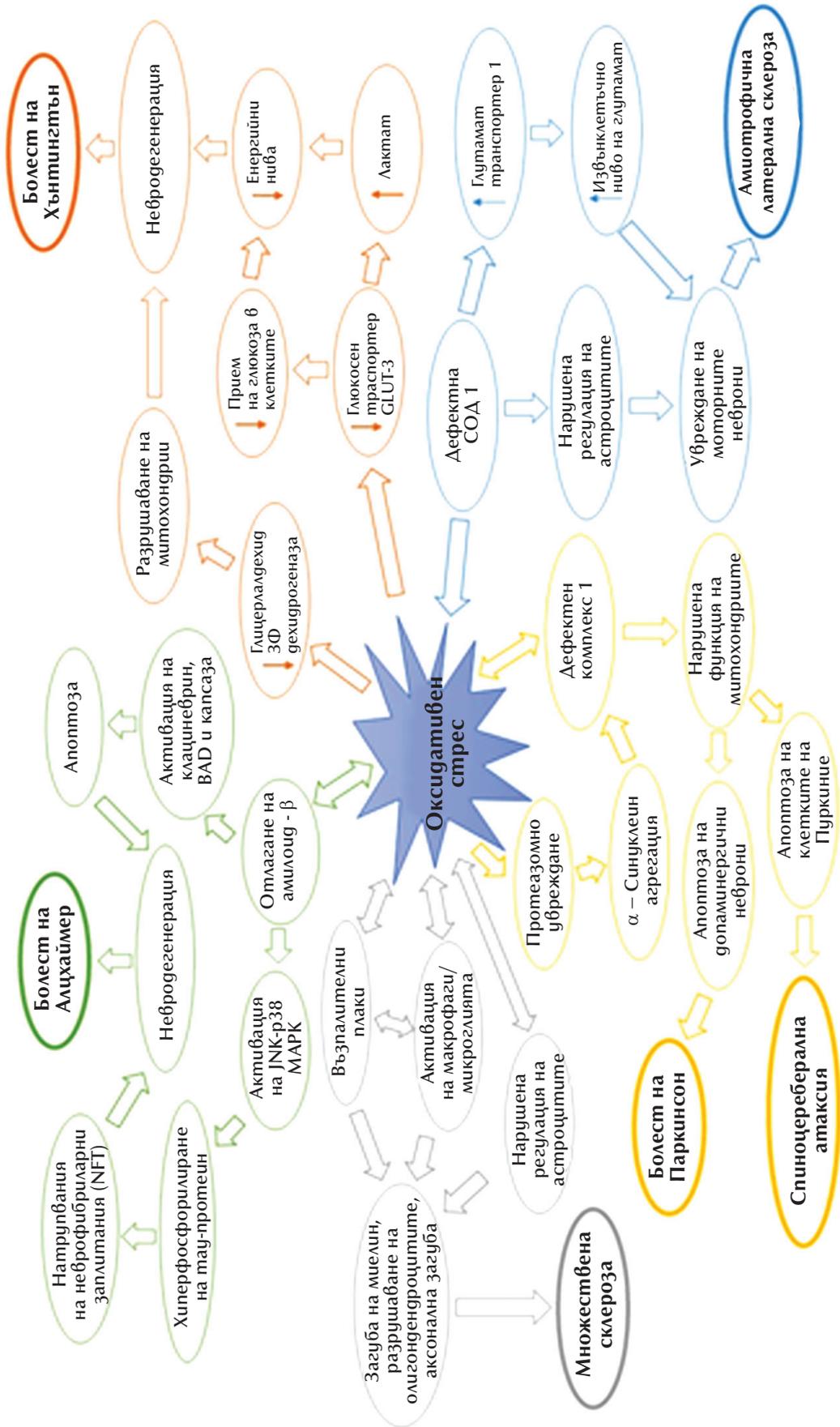
Основните видове реактивни форми, които се наблюдават в организма са с участието на кислород (Reactive Oxygen Species, ROS) и азот (Reactive Nitrogen Species, RNS). Те могат да имат *ендогенен* (митохондри, пероксиди, ендоплазматичен ретикулум, фагоцити, ксантин оксидаза, метаболитни пътища на арахидоновата киселина, увреждания в следствие на исхемия/реперфузия, реакции включващи метали с променлива валентност, физически натоварвания и др.) или *екзогенен произход* (цигарен дим, алкохол, пестициди, изгорели газове, замърсяване с тежки метали, озон, йонизираща радиация, медикаменти и др.) (1). Процесите на синтез и неутрализиране на свободните радикали се намират в равновесие в човешкия организъм. Нарушението на това равновесие се обозначава като оксидативен стрес (2).

#### Роля на свободните радикали и оксидативния стрес в развитието на хронични и остри патологични процеси

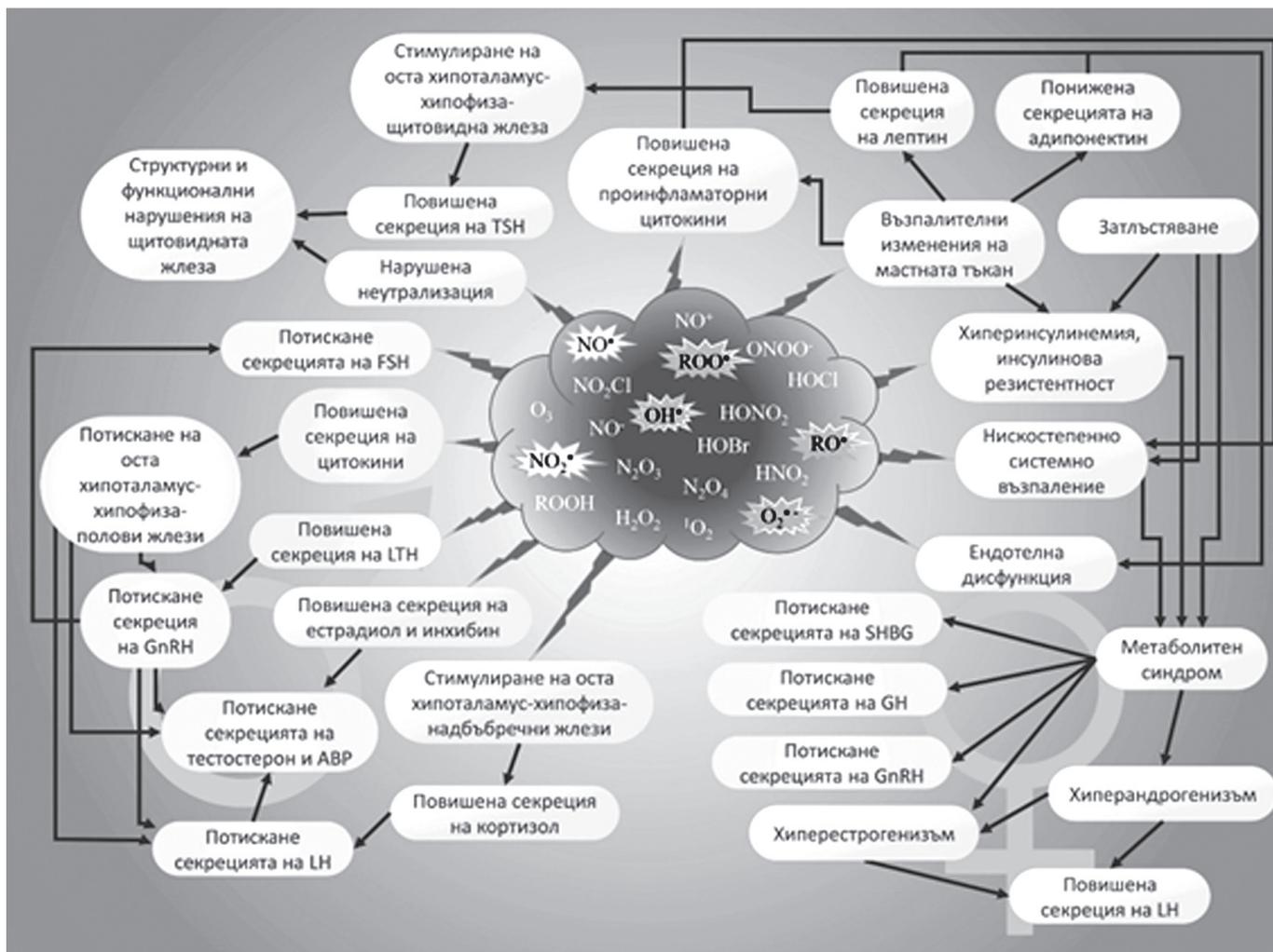
Публикуваните в литературата анализи свързват оксидативния стрес както с възникването, така и с прогресията на много заболява-

ния, включително дегенеративни и онкологични (3). Според СЗО хроничните дегенеративни заболявания са водеща причина за заболяемост и смъртност вече не само в развитите страни, но и в тези с ниски и средни доходи (4). Към тази група принадлежат различни увреждания на нервната система, на сърдечно-съдовата, на ендокринната и други. Като обща характеристика при всички е необратимата увреда на тъканите.

Патогенетичните механизми на невродегенеративните заболявания са много различни, но общото между тях е участието на оксидативния стрес в клетъчната увреда. Възникването на оксидативен стрес може да бъде както поради повишена продукция на свободни радикали, така и поради понижена ефективност на антиоксидантните системи в организма. Независимо че той може да не е отключващ фактор за развитие на болестта, участва активно в нейната прогресия (Фиг. 1) (5, 6). Изявата на заболяването в някои случаи е свързана със загуба на голям брой клетки (напр. при болестта на Паркинсон промяната в двигателната активност се наблюдава едва след загуба на >60% от допаминергичните неврони в субстанция нигра, или да имитира други заболявания (множествена склероза) (5-7).



**Фигура 1.** Участие на оксидативния стрес при развитието на някои невродегенеративни заболявания (по материали от 5, 6)



**Фигура 2.** Участие на оксидативния стрес при някои ендокринни нарушения

По отношение на сърдечно-съдовата система слабо покачване на нивата на свободните радикали влияе антисклеротично и про-ангиогенно. Големите количества свободни радикали се свързват с окисление на мембранните липиди и тези участващи в липопротеините с ниска плътност (LDL), ендотелна дисфункция в резултат на активация на клетките на ендотела, експресия на адхезионни молекули, повишена експресия на проинфламаторни гени и клетъчни фактори на растежа, и привличане на моноцити, тромбоцитна агрегация и тромбоза (8).

При пациенти с преддиабет, новооткрит или дългогодишен захарен диабет тип II, нивата на оксидативен стрес, оценени чрез анализ на 8-изопростагландин-Ф2-алфа (8-isoPGF2-alpha), са високи. Най-високи стойности на маркерите за оксидативен стрес се измерват в групата с дългогодишен захарен диабет и са пряко свързани с

количеството висцерална мастна тъкан и нивата на кръвна захар след нахранване. Освен това е налице и силна положителна корелация между 8-isoPGF2-alpha и гликирания хемоглобин (9).

Патогенезата на често срещаната Базедова болест (болест на Грейвс) се характеризира с хиперметаболизъм, повишена консумация на кислород, нарушена функция на митохондриите и в резултат повишено отделяне на свободни радикали. Уврежданията в резултат на получения оксидативен стрес са както в щитовидната жлеза, така и в периферните тъкани. Установени са повишени стойности на 8-изопростани при пациенти с това заболяване в сравнение с контролна група (10).

Оксидативният стрес играе основна роля и при синдрома на поликистозните яйчници (PCOS), една от най-честите причини за овариална дисфункция, засягаща до 10% от жените

в репродуктивна възраст. Повишените стойности на изопростаните при това заболяване корелират положително със стойностите на НОМА индекс, LDL-холестерол, триглицериди, хомоцистеин и аполипопротеин В (11).

На *Фигура 2* е систематизирано участието на оксидативния стрес в патогенезата на редица ендокринни и метаболитни нарушения (*Фиг. 2*).

Голяма част от хроничните заболявания се характеризират със замяна на функциониращата тъкан с фиброзна, като свободните радикали и продуктите на тяхното действие са основни модулатори на макрофагите и фибробластите участващи в този процес. Апоптозата на алвеоларните епителни клетки при пациенти с идиопатична пулмонална фиброза, асбестоза или силикоза, която се индуцира от свободните радикали, допълнително се подсилва в отговор на повишеното им излъчване от увредените алвеоларни митохондрии. Този процес възпрепятства възстановяването на белодробния паренхим и улеснява белодробната фиброза (12). При чернодробна стеатоза и неалкохолна стеатохонепатит повишените стойности на Ф2-изопростаните се свързват с повишена активност на звездовидните клетки, продукцията на колаген и развитието на фиброзни изменения (13).

При онкологични заболявания оксидативният стрес играе роля и в трите основни етапа в развитието на онкологичните заболявания – инициация, промоция и прогресия. Първият етап често започва в резултат на действието на свободните радикали, които директно увреждат молекулата на ДНК и ефективно повишават възможността за мутации и онкогенна трансформация на клетките, или да е опосредстван чрез сигнални пътища активирани от свободните радикали. Във втория етап свободните радикали могат да доведат до нарушена генна експресия, блокиране на комуникацията между клетките, повишена клетъчна пролиферация и потискане на апоптозата на новообразуваните клетки. В етапа на прогресия свободните радикали могат допълнително да променят структурата на ДНК в новосъздадената клетъчна популация (14).

Освен при хронични заболявания, оксидативният стрес участва в патофизиологичните механизми и при остри заболявания, като при някои от тях нивата на 8-isoPGF2- $\alpha$  могат да се използват за оценка на състоянието и прогресията на заболяването. При пневмонията придобита в обществото нивата на 8-iso PGF2- $\alpha$  и инфламаторните цитокини нарастват с

влошаване на заболяването, като най-високите стойности са свързани с летален изход (15).

Ролята на оксидативния стрес се изучава и във връзка с процесите на стареене. Нарушенията във функцията на митохондриите в резултат на оксидативен стрес в клетката и възникналите промени в митохондриалната ДНК в следствие на това, се разглеждат като вероятна причина за процеса на остаряване, както и на свързаните с него заболявания (8).

Многообразните механизми и роли, които играе оксидативният стрес в различни процеси в организма, изискват той да бъде измерен с подходящи методи.

### Методи за анализ на оксидативния стрес

Реактивните кислородни и азотни видове включват както сравнително стабилни молекули като водороден пероксид и алкил хидропероксид, така и силно реактивните хидроксиден, супероксиден и алкоксиден радикал (16). Силно реактивните свободни радикали успяват да просъществуват самостоятелно за много малък отрязък от време (10-9-10-12sec) (17). Ето защо анализът на свободните радикали в човешкия организъм е доста сложен и може да бъде осъществен единствено чрез електрон спин резонансна спектроскопия – техника, трудно приложима в ежедневната лабораторна практика (18). Към настоящият момент косвено се съди за наличието на свободни радикали чрез измерване на продуктите от тяхното действие върху различните видове биологични молекули. Поради факта, че повечето тестове за оксидативен стрес не измерват директно съотношението прооксиданти/антиоксиданти в организма, все още няма единно становище кой от всички тестове за анализ на оксидативния стрес в организма е най-подходящ за рутинно използване в лабораториите (18).

Могат да се изследват индивидуалните продукти от окислението на аминокиселините като битирозин, орто-тирозин, 2-оксо-хистидин, глутамат полуалдехид, адипинов полуалдехид, валин хидроксид, левцин хидроксид, L-дихидроксифенилаланин (L-DOPA), както и битирозин съдържащи кръстосано свързани протеини (19).

*Тринитротирозинът*, основен продукт на действието на някои реактивните азотни форми, е един от широко проучваните маркери в последните години (20). Разработените газ-хроматографски методи за неговото определяне се характеризират с висока точност и

чувствителност, но също и времемемкост, докато течностно-хроматографските и широко разпространените ELISA-базираните методи имат по-ниска чувствителност и не много добра точност (21). За определяне на концентрацията на общото съдържание на карбонилни групи в протеините може да се използва реакцията им с 2,4-динитрофенилхидразин (DNPH) последвана от спектрофотометрично отчитане на получения продукт (22). За съжаление реакцията не е специфична, защото DNPH реагира и с тиоалдехид. Също така е възможно и използването на флуоресцентно багрило например хидроксилламин, флуоресцеин-5-тиосемикарбазид или дериватизация с биотинхидразин и визуализация с авидин след гел-електрофореза (23). Количественият анализ на окислените протеини е изключително труден от една страна поради голямото многообразие от промени на аминокиселинните остатъци, които могат да се наблюдават, а от друга страна поради допълнителните модификации в резултат от взаимодействието им с окислителни продукти на други молекули като липиди и въглехидрати (24).

Най-често използваният маркер за увреждане на ДНК е 8-хидрокси-2-деоксигуанозин (8-OHdG), който се получава при 8-хидроксилиране на гуанина, като окислените бази от ДНК се заменят с нови, а повредените се екскретират в кръвта и съответно в урината (25). Негостатък на определянето на 8-хидрокси-2-деоксигуанозина е арificialното повишаване на концентрацията му в пробата в процеса на изолация на ДНК, разликите в окислението на митохондриална и ядрена ДНК, влияние на външни антиоксиданти приемани с храната, място на увредата – активни или неактивни гени, в зоната на теломерите или на участък без смисъл и не на последно място вид на клетките и тъканите от които е изолирана ДНК (19).

Доста широко разпространено е определянето на малондиалдехид за оценка на оксидативен стрес. Най-често той се изследва посредством реакция с тиобарбитурова киселина (ТБА) – метод, който въпреки ниската си себестойност, се характеризира с лоша възпроизводимост, ниска специфичност, малка стабилност на използваните калибратори и контроли (26). Съществуващите данни за корелация между стойностите, получени с тиобартитуровия тест за определяне на малондиалдехид и други маркери за оксидативен стрес (например 8-OHdG), доказват единствено наличие на други продукти на оксидативния стрес, реагиращи с тиобартитуровата киселина (27). Предлагат се

и методи за определяне на малондиалдехид посредством или чрез ензимно свързан имуносорбентен анализ (ELISA) или биосензори (28).

За разлика от малондиалдехида, *изопростаните* са стабилни молекули и като такива могат да служат за оценка на оксидативния стрес в организма. Те се откриват в редица тъкани и течности в организма като плазма, урина, ликвор, бронхоалвеоларен лаваж, слюнка и жлъчка (29). От друга страна, тяхната концентрация лесно се изменя в положителна посока, след вземане на биологичната проба, ако в нея има наличие на фосфолипиди, включващи арахидонова киселина, и при липса на добавен антиоксидант. Ето защо е особена важност незабавното центрофугиране и замразяване на биологичните проби веднага след вземането им, съхранението им при – 80°C, или използването на подходящ антиоксидант, като бутилиран хидрокситолуен (BHT), глутатион (GSH), индометацин или комбинация от тях. Опитите показват, че образуването на изопростани *ex vivo* в биологичните проби продължава, дори ако те са поставени за съхранение във фризер при -20°C (30). Изопростаните се откриват в биологичната матрица в свободна форма, свързани с протеини или в естерифицирана форма. За количествен анализ на тоталното съдържание на изопростани е необходимо свързаните изопростани да се освободят, като обикновено това се постига посредством алкална хидролиза (30–32).

При анализ на кръвни проби (плазма, серум) е необходимо да се избягват такива с хемолиза, тъй като тя се свързва с освобождаване на големи количества фосфолипиди в пробата, и със съответно повече продукти на липидната пероксидация (33).

Наличието на кръвно-мозъчна бариера затруднява в голяма степен диагностиката и лечението на заболяванията на ЦНС. Анализът на изопростани в ликвор може да се използва като маркер на оксидативните промени при невродегенеративните заболявания (34,35).

Независимо от инвазивния характер на пробовземането, анализът на амниотичната течност може да даде богата информация за здравето на плода и плацентата, която не би могла да се получи по друг начин. Изследването на 8-isoPGF2- $\alpha$  може да се използва като потенциален предиктивен маркер, тъй като повишените му стойности се наблюдават при бременни, които в последствие развиват прееклампсия (36). Нарушенията на околоплодния сак и забавяне в интраутеринното развитие също се свързват с нарастване на концентрацията

на изопростаните в околоплодната течност. При вродени заболявания, като синдром на Даун, се установяват многократно повишени стойности на същия показател (37).

Много добра информативна стойност за прогресията на интерстициалните заболявания на белия гроб има анализът на изопростани в проба от бронхоалвеоларен лаваж (БАЛ) или в храчка. Храчката съдържа смес от слюнка и мucus от горните отдели на дихателния тракт и дава информация по-скоро за трахео-бронхиалното гърво, докато БАЛ – за долните отдели и съдържащието на алвеолите (38).

Един от най-често използваните биологични материали за анализ на изопростани е урината. Основното предимство на използването на уринни проби е неинвазивния характер на пробовземането, ето защо това е предпочитан биологичен материал от повечето учени. Недостатъците се свързват с лошата стандартизация на процеса на пробовземане, както и наличието на вещества, променящи процеса на йонизация на анализите при мас спектрометричната детекция, които с помощта на подходящи техники могат до голяма степен да бъдат компенсирани (39).

Слюнката като алтернативен източник на информация за здравето на организма има редица преимущества. Най-основните са свързани с неинвазивния характер на вземане на пробата, възможността пробовземането да се извършва от всеки и дори в дома на пациента (отпада нуждата от специално обучен персонал), нисък риск за организма от самото пробовземане, нисък риск от кръстосано замърсяване на пробите, съпоставими резултати с кръвните проби за една част от метаболитите (40). При анализ на изопростани в слюнка от особено значение е начинът на пробовземане, което е в състояние не само да увеличи, но и да намали стойностите на получените резултати. Например използването на система за пробовземане на слюнка не винаги е най-удачният вариант и може чувствително да промени получените концентрации (41).

### **Анализ на изопространи**

Възможностите за анализ на изопростани в биологична матрица се свеждат до две основни групи методи – хроматографски с мас спектрометрична детекция и имунохимични.

#### **Хроматографски методи**

Представяват разделителни методи, при които съставните компоненти на анализирана-

та смес се разпределят между две несмесващи се фази – едната неподвижна, заредена в колона или разстлана на плоскост и другата подвижна – газова или течна (42). Концентрационният диапазон, в който обикновено се намират стойностите на 8-isoPGF2-alpha в биологичните течности, е от ng/L до µg/L, което налага използването на много чувствителни детектори при анализа.

#### *Газова хроматография с мас спектрометрия.*

Аналитичният метод, с помощта на който за пръв път са определени F2-изопростани, също е от този тип (43). Методът се базира на дериватизация на изопростаните до пента-флуоробензилови естери и триметилсилилови летливи деривати. Голяма част от последващо публикуваните методи се базира на този (35, 44, 45). По-ново разработените методи използват газова хроматография с тандем мас спектрометричен завършек и вътрешна стандартизация (31). Основните ограничения на газово-хроматографските методи са свързани с възможността за анализ само на летливи вещества. Това налага въвеждането на допълнителна – дериватизационна процедура за превръщане на анализирани вещества в по-лесно летливи. Газ-хроматографските методи с мас спектрометрична детекция са чувствителни и специфични, но имат сложна и трудоемка пробоподготовка.

#### *Високоэффективна течна хроматография с мас спектрометрия*

Използването на този тип методи навлиза малко по-късно при анализа на изопростани. Основно предимство на течно-хроматографския анализ в сравнение с газово-хроматографския е липсата на необходимост от дериватизация на по-слабо летливите анализи (46). Пробоподготовката включва използване на твърдофазова и/или течна-течна екстракция на изопростаните от биологичната матрица. Всички публикувани течно-хроматографски методи до момента включват разделяне с помощта на високоэффективна течна хроматография с обратна фаза, отрицателна йонизация (електроспрей или химична) и тандем мас спектрометрична детекция (32, 47, 48). При повечето от публикуваните до момента методи е използван тройноквадруполен анализатор, а при една малка част QTRAP, QTOF или FTICR анализатори (47, 49, 50).

### Имунохимични методи

Базирант се на реакцията антиген-антитяло. В литературата са публикувани данни за използването на два типа имунохимични методи:

#### Радиоимунохимични методи (RIA)

В единственият публикуван до момента радиоимунохимичен метод се използва маркиран с радиоактивен водороден изотоп тритий (<sup>3</sup>H) антиген (8-isoPGF2-alpha), който се свързва със специфични антитела (51). Методът има много добра чувствителност (23 pmoL/L), но както при повечето имунохимични методи проблем е кръстосаната реактивност с други изопростани и простагландини.

#### Ензимни имунохимични методи

Ензимните имунохимични методи са най-широко разпространените методи в последните няколко години поради сравнително малките инвестиции в оборудване и ниската себестой

ност на отделния тест от една страна, както и сравнително високата чувствителност от друга (52–54). Предлаганите на пазара китове са за анализ на 8-isoPGF2-alpha в различни биологични материали като плазма, серум, урина, тъканни проби и др.

**В заключение**, изопростаните като основен продукт на липидната пероксидация в резултат на действието на свободните радикали поради тяхната стабилност и наличност във всички течности в организма могат да дават надеждна информация за оксидативен стрес в организма. От съществуващите към момента методи за анализ на изопростани най-широко разпространени са ензимно-имунохимичните. Приложението на течностно-хроматографски методи е все още ограничено, но предпоставя възможност за разработване и валидиране на нови такива за анализ на 8-isoPGF2-alpha в различни биологични матрици, които да бъдат предложени за диагностика в ежедневната практика.

## References

1. **Ahmad SI.** Reactive Oxygen Species in Biology and Human Health [Internet]. In: Reactive Oxygen Species in Biology and Human Health. *Ahmad SI, editor. Boca Raton : Taylor & Francis, 2016: CRC Press; 2017. 1–585 p.*
2. **Kosekova G, Mitev V, Alekseev A.** Biochemistry on the Internet: Lectures on medical biochemistry. *Third ed. Sofia: Central Medical Library; 2016. 456 стр. (In Bulgarian) [Косекова Г, Митев В, Алексеев А. Биохимия в интернет: Лекции по медицинска биохимия. Трето изд. София: Централна медицинска библиотека; 2016. 456 p.]*
3. **Filaire E, Dupuis C, Galvaing G, Aubreton S, Laurent H, Richard R, et al.** Lung cancer: What are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition. *Lung Cancer 2013; 82(3): 383–389.*
4. **WHO** General Director. *Address to the Regional Committee for the Americas. 2007.*
5. **Liu Z, Zhou T, Ziegler AC, Dimitrion P, Zuo L.** Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxid Med Cell Longev 2017; 2017(8): 1–11.*
6. **Ohl K, Tenbrock K, Kipp M.** Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. *Exp Neurol 2016; 277: 58–67.*
7. **Wallace DC.** A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found Symp 2001; 235: 247–266.*
8. **Chiang S, Kalinowski DS, Jansson PJ, Richardson DR, Huang MLH.** Mitochondrial dysfunction in the neurodegenerative and cardio-degenerative disease, Friedreich's ataxia. *Neurochem Int 2018; 117:3 5–48.*
9. **Morsi HK, Ismail MM.** The value of 8-iso prostaglandin F2 alpha and superoxide dismutase activity as a clinical indicator of oxidative stress in type II diabetes mellitus. *J Clin Diagnostic Res 2018; 12(11): 10–14.*
10. **Bastug E, Tasliyurt T, Kutluturk F, Sahin S, Yilmaz A, Sivgin H, et al.** Evaluation of Oxidative Status with Exhaled Breath 8-isoprostanone Levels in Patients with Hyperthyroidism. *Endocrine' Metab Immune Disord Targets 2014; 13(4): 306–310.*
11. **Calzada M, López N, Noguera JA, Mendiola J, Torres AM.** Elevation of isoprostanes in polycystic ovary syndrome and its relationship with cardiovascular risk factors. *J Endocrinol Invest 2019; 42(1): 75–83.*
12. **Liu X, Chen Z.** The pathophysiological role of mitochondrial oxidative stress in lung diseases. *J Transl Med 2017; 15(1): 1–13.*
13. **Comporti M, Arezzini B, Signorini C, Sgherri C, Monaco B, Gardi C.** F2-isoprostanes stimulate collagen synthesis in activated hepatic stellate cells: A link with liver fibrosis? *Lab Invest 2005; 85(11): 1381–1391.*
14. **Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB.** Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med 2010; 49(11): 1603–1616.*
15. **Zheng L, Fei J, Feng CM, Xu Z, Fu L, Zhao H.** Serum

8-iso-PGF2 $\alpha$  Predicts the Severity and Prognosis in Patients With Community-Acquired Pneumonia: A Retrospective Cohort Study. *Front Med* 2021; 8 (March):1–8.

16. **Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P.** Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: Research applications in the cancer field. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019.

17. **Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA.** In: Harper's illustrated biochemistry. 28th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2012. 693 p.

18. **Jones DP.** Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8.

19. **Tejchman K, Kotfis K, Sienko J.** Biomarkers and mechanisms of oxidative stress—last 20 years of research with an emphasis on kidney damage and renal transplantation. *Int J Mol Sci* 2021; 22(15).

20. **Bandookwala M, Sengupta P.** 3-Nitrotyrosine: a versatile oxidative stress biomarker for major neuro-degenerative diseases. *Int J Neurosci* 2020; 130(10): 1047–1062.

21. **Teixeira D, Fernandes R, Prudêncio C, Vieira M.** 3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges. *Biochimie* 2016; 125: 1–11.

22. **Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues J V., Marcos JC.** Simplified 2,4-dinitrophenyl-hydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem* 2014; 458: 69–71.

23. **Wu J, Luo X, Jing S, Yan LJ.** Two-dimensional gel electrophoretic detection of protein carbonyls derivatized with biotin-hydrazide. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2016; 1019: 128–131.

24. **Møller IM, Rogowska-Wrzęsinska A, Rao RSP.** Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J Proteomics* 2011; 74(11): 2228–2242.

25. **Il'yasova D, Scarbrough P, Spasojevic I.** Urinary biomarkers of oxidative status. *Clin Chim Acta* 2012; 413(19–20): 1446–1453.

26. **Khoubnasabjafari M, Ansarin K, Jouyban A.** Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts [Internet]*. 2015;5(3):123–7.

27. **Liu Z, Liu Y, Tu X, Shen H, Qiu H, Chen H, et al.** High Serum Levels of Malondialdehyde and 8-OHdG are both Associated with Early Cognitive Impairment in Patients with Acute Ischaemic Stroke. *Sci Rep* 2017; 7(1): 1–8.

28. **Chunta S, Suedee R, Boonsriwong W, Lieberzeit PA.** Biomimetic sensors targeting oxidized-low-density lipoprotein with molecularly imprinted polymers. *Anal Chim Acta* 2020; 1116: 27–35.

29. **Liu W, Morrow JD, Yin H.** Quantification of F2-isoprostanes as a reliable index of oxidative stress in vivo using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(8): 1101–1107.

30. **Milne GL, Yin H, Brooks JD, Sanchez S, Jackson Roberts L, Morrow JD.** Quantification of F2-Isoprostanes in Biological Fluids and Tissues as a Measure of Oxidant Stress. *Methods Enzymol* 2007; 433: 113–126.

31. **Briskey DR, Wilson GR, Fassett RG, Coombes JS.** Optimized method for quantification of total F2-isoprostanes using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 90: 161–166.

32. **Vinel C, Elie Pereira O, Dupuy A, Bertrand-Michel J, Laoudj-Chenivesse D, Rolland Y, et al.** Isoprostanes as markers for muscle aging in older athletes. *Biochim Open* 2017; 6: 1–8.

33. **Halliwell B, Lee CYJ.** Using isoprostanes as biomarkers of oxidative stress: Some rarely considered issues. *Antioxidants Redox Signal* 2010; 13(2): 145–156.

34. **Halliwell B, Whiteman M.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142(2): 231–255.

35. **Mattsson N, Haghghi S, Andersen O, Yao Y, Rosengren L, Blennow K, et al.** Elevated cerebrospinal fluid F2-isoprostane levels indicating oxidative stress in healthy siblings of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett* 2007; 414(3): 233–236.

36. **Wang CN, Chen JYS, Sabu S, Chang YL, Chang SD, Kao CC, et al.** Elevated amniotic fluid F2-isoprostane: A potential predictive marker for preeclampsia. *Free Radic Biol Med* 2011; 50(9): 1124–1130.

37. **Belik J, González-Luis GE, Perez-Vizzaino F, Villamor E.** Isoprostanes in fetal and neonatal health and disease. *Free Radic Biol Med* 2010; 48(2): 177–188.

38. **Guthrie JW.** General Considerations when Dealing with Biological Fluid Samples. In: Comprehensive Sampling and Sample Preparation. Elsevier; 2012. p. 1–19.

39. **Khamis MM, Adamko DJ, El-Aneed A.** Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery. *Mass Spectrom Rev* 2017; 36(2): 115–134.

40. **Kamodyová N, Tóthová L, Celec P.** Salivary markers of oxidative stress and antioxidant status: Influence of external factors. *Dis Markers* 2013; 34(5): 313–321.

41. **Kamodyová N, Celec P.** Salivary markers of oxidative stress and Salivette collection systems. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(11): 1887–1890.

42. **Svinarov D.** Chromatography. In: Tsvetkova T, Danev S, editors. Analytical principles and procedures in the clinical laboratory. Plovdiv: VAP; 2001. p. 296–301 (In Bulgarian) [Свинаров Д. Хроматография. In: Цветковца Т, Данев С, editors. Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория. Пловдив: ВАП; 2001. p. 296–301].

43. **Morrow JD, Harris TM, Jackson Roberts L.** Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: Analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem* 1990; 184(1): 1–10.

44. **Parker CE, Graham LB, Nguyen MN, Gladen BC, Kadiiska MB, Barrett JC, et al.** An improved GC/MS-based procedure for the quantitation of the isoprostane 15-F2t-IsoP in rat plasma. *Mol Biotechnol* 2001; 18(2): 105–118.

45. **Sampson MJ, Gopaul N, Davies IR, Hughes DA, Carrier MJ.** Plasma F2 Isoprostanes. *Diabetes Care* 2002; 25(3): 537–541.

## References

46. Coolen SA, van Buuren B, Duchateau G, Upritchard J, Verhagen H. Kinetics of biomarkers: biological and technical validity of isoprostanes in plasma. *Amino Acids* 2005; 29(4): 429–436.
47. Rund KM, Ostermann AI, Kutzner L, Galano J marie, Oger C, Vigor C, et al. Development of an LC-ESI(-)-MS/MS method for the simultaneous quantification of 35 isoprostanes and isofurans derived from the major n3- and n6-PUFAs. *Anal Chim Acta* 2018; 1037: 63–74.
48. Peña-Bautista C, Carrascosa-Marco P, Oger C, Vigor C, Galano JM, Durand T, et al. Validated analytical method to determine new salivary lipid peroxidation compounds as potential neurodegenerative biomarkers. *J Pharm Biomed Anal* 2019; 164: 742–749.
49. Ryu Y, Reid MJ, Thomas K V. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry with immunoaffinity clean-up for the determination of the oxidative stress biomarker 8-iso-prostaglandin F2alpha in wastewater. *J Chromatogr A* 2015; 1409: 146–151.
50. Larose J, Julien P, Bilodeau JF. Analysis of F2-isoprostanes in plasma of pregnant women by HPLC-MS/MS using a column packed with core-shell particles. *J Lipid Res* 2013; 54(5): 1505–1511.
51. Basu S. Radioimmunosassay of 8-isoprostaglandin F(2α): An index for oxidative injury via free radical catalysed lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 1998; 58(4): 319–325.
52. Dinesan AS, Ravindran R. Evaluation of Salivary 8-Isoprostane in Oral Lichen Planus: Case Control Study. *J Orofac Sci* 2020; 12(2): 113–118.
53. Solaz-García A, Lara-Cantón I, Peña-Bautista C, Cháfer-Pericás C, Cañada-Martínez AJ, Pinilla-González A, et al. Non-invasive monitoring of saliva can be used to identify oxidative stress biomarkers in preterm and term newborn infants. *Acta Paediatr Int J Paediatr* 2021; 110(12): 3255–3260.
54. Wiśniewski K, Bieńkowski M, Tomasik B, Braun M, Bobeff EJ, Liberski PP, et al. Urinary F2-Isoprostane Concentration as a Poor Prognostic Factor After Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg* 2017; 107: 185–193.

### Address for correspondence:

#### Десислав Г. Томов,

Категра по Биоорганична химия, ФФ,  
МУ-Пловдив, ул. „Братя Бъкстон„ 120,  
сграда НИМУ,  
Пловдив 4004, България,  
e-mai:desislavtomov@gmail.com

#### Desislav G. Tomov,

Department of Bioorganic Chemistry, FF,  
MU-Plovdiv, 120, Bratya Buxton Street,  
NIMU building,  
Plovdiv 4004, Bulgaria,  
e-mail: desislavtomov@gmail.com

## Насоки за изготвяне на електронен постер (ePoster):

В платформата могат да се приемат само електронни постери в PDF формат.

- Всички електронни постери трябва да бъдат само на една страница
- Постерът/файлът трябва да е .jpeg, .png формат – 9:16 format, Вертикален full HD (съответно резолюция 1080 x 1920 pxls.)
- В случай, че използвате Photoshop, за да създадете своя ePoster, можете да видите и неговата разделителна способност, която трябва да бъде минимум 200dpi.
- Хипервръзки, анимирани изображения и анимации не са разрешени за ePosters и няма да функционират.
- Моля, поддържайте размера на PDF файла възможно най-малък, за да може успешно да се качи в системата (следователно не използвайте изключително висококачествени изображения).

Крайният срок за качване ще бъде 3 седмици преди началото на Конгреса т.е до 01. 09. 2023г., така че да има достатъчно време и за евентуални корекции.

Надявам се с тези напътствия да сме в помощ заедно с Техническата фирма на Конгреса!  
**С най-добри пожелания за успешно участие в предстоящия Конгрес по ендокринология,**  
**Проф. Анна-Мария Борисова**

## Клъстерна класификация на захарен диабет

**Бечева, Елена А., Илиев, Димитър А., Станчев, Павел Е., Орбецова, Мария М.**

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, Катедра по Ендокринология, Медицински факултет, Медицински университет, Пловдив

Постъпване: 02. 07. 2023

Ревизиране: 22. 07. 2023

Приемане: 24. 07. 2023

## Cluster Classification of Diabetes Mellitus

**Becheva, Elena A., Iliev, Dimitar A., Stanchev, Pavel E., Orbetzova, Maria M.**

Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, „Sv. Georgy“ University Hospital, Department of Endocrinology, Faculty of Medicine, Medical University, Plovdiv

Submitted: 02. 07. 2023

Revised: 22. 07. 2023

Accepted: 24. 07. 2023

### Резюме

Захарният диабет е хронично заболяване, представляващо значим здравен, медико-социален и икономически проблем. Сложната етиопатогенеза предполага разделянето му на повече от досега познатите основни типове – захарен диабет тип 1, захарен диабет тип 2, гестационен захарен диабет и симптоматичен захарен диабет. Въвеждането на нова клъстерна класификация, разделяща пациентите на 5 специфични групи, би помогнало на специалистите да индивидуализират терапевтичния си подход и добре да дефинират наличието на усложнения още при поставянето на диагнозата. С помощта на оценяването на следните 6 показателя – възраст, индекс на телесна маса (ИТМ),  $HbA_{1c}$ , наличие на анти-GAD65 антитела, оценка на бета-клетъчната функция (НОМА2-В) и на инсулиновата резистентност (НОМА2-IR), захарният диабет може да бъде отнесен в някоя от следните групи – тежък аутоимунен, тежък инсулин-дефицитен, тежък инсулин-резистентен, лек, свързан със затлъстяване, и лек, свързан с възрастта захарен диабет. Стремешът към персонализиран подход би подобрил здравето на пациентите, би отложил инвалидиращите усложнения и би намалил здравните разхо-

### Abstract

Diabetes mellitus is a chronic disease representing a significant health, medico-social and economic problem. The complex etiopathogenesis suggests its division into more than the hitherto known main types – diabetes mellitus type 1, diabetes mellitus type 2, gestational diabetes mellitus and symptomatic diabetes mellitus. The introduction of a new cluster classification, dividing patients into 5 specific groups, would help specialists to individualize their therapeutic approach and comprehensively define the presence of complications at the time of diagnosis. By evaluating the following 6 indicators – age, body mass index (BMI),  $HbA_{1c}$ , presence of anti-GAD65 antibodies, assessment of beta-cell function (HOMA2-B) and insulin resistance (HOMA2-IR), diabetes mellitus can be classified into any of the following groups – severe autoimmune, severe insulin-deficient, severe insulin-resistant, mild obesity-related, and mild age-related diabetes mellitus. Pursuing a personalized approach would improve patient health, delay debilitating complications, and reduce healthcare costs by directing them toward disease-specific prevention and management.

ги, насочвайки ги към профилактика и третиране на конкретното заболяване.

В настоящата обзорна статия са разглеждани в частност специфичните характеристики на различните клъстери, тяхната честота и обвързаност с конкретно усложнение, базирани на данни от различни проучвания сред популации по света, показващи тяхната значимост и необходимост от използване в ежедневната практика.

---

**Ключови думи:**

захарен диабет, клъстерна класификация, терапевтичен подход, усложнения на захарен диабет

---

**Въведение – класификация на захарния диабет в исторически план**

Захарният диабет е един от най-значимите медицински проблеми в световен мащаб – почти 537 милиона хора на възраст между 20 и 79 години страдат от заболяването, като това се равнява на 10,5% от световното население. През 2030 г. се очаква здравните разходи за лечение и управление на захарния диабет да достигнат над 1 трилион долара (1).

Опитите за разделяне на захарния диабет на отделни типове датират от дълбока древност. Гръцкият лекар Aretaeus (81–138 г. от н.е.) дава описание за първи път на заболяване, което нарича „диабет“ (от гръцки διαβαίνω – преминавам), като по този начин охарактеризира повишеното отделяне на урина при това състояние (2). Още през 5-ти и 6-ти век първите аюрведични учени Sushruta и Charaka описват сладка на вкус урина, наричана „Madhumeha“ или още „медена урина“ и изказват съмнение за съществуването на два типа диабет – единият, свързан с младата възраст, а вторият, обвързан със затлъстяване (3). През 1788 г. Thomas Sawley след аутопсия на диабетно болен излага предположение за връзката на панкреаса с това заболяване, след като открива белези за тъканна увреда в този орган (3).

През 1866 г. G. Harley изказва предположение, че съществуват поне 2 вида захарен диабет, които изискват диаметрално противоположно лечение (4). Френският учен E. Lapsergeaux разграничава захарен диабет при високо тегло и такъв при ниско или нормално

In the present review article, the specific characteristics of the different clusters, their frequency and association with a specific complication, based on data from different studies among populations around the world, showing their importance and necessity of use in daily practice, are discussed in particular.

---

**Key words:**

diabetes mellitus, cluster classification, therapeutic approach, complications of diabetes mellitus

---

тегло „diabete gras“ и „diabete maigre“ (5). Разликата между двете форми на захарен диабет наистина е била ясна още в ерата преди откриване на инсулина и въвеждането му като лечение. Установява се, че повечето деца и някои хора в зряла възраст умират от захарен диабет в рамките на няколко месеца, докато по-възрастни хора с наднормено тегло често оцеляват с години.

R. D. Lawrence (6) също изучава наличието на дефицит на инсулин при част от хората със захарен диабет и отсъствието му при други. През 1926 г. той за първи път верифицира количественото съдържание на инсулин в серума, изучава ефектите му върху глюкозната наличност под влияние на физическа активност и приемане на въглехидратна храна и в тази връзка – механизмите на възникване на хипогликемия. Набелязва практически съвети за поддържаща диета и регулиране на инсулиновата доза в зависимост от храненето и двигателния режим, насочва вниманието към персонализиран подход в лечението на захарния диабет в зависимост от нуждата от инсулин (6).

W. Falta и съпр. (7) през 1931 г. изказват становище за съществуването на инсулин-чувствителни и инсулин-резистентни форми на захарен диабет. Приложението на инсулин при инсулин-чувствителните пациенти потиска отделянето на глюкоза в урината и води до хипогликемия, докато спирането на инсулина бързо води до глюкозурия и кетоза, докато при инсулин-резистентни пациенти не се наблюдават подобни промени (7). Аналогични диагностични тестове прилага и H.P.

Himsworth (8) през 30-те години на миналия век и разграничава двата основни типа захарен диабет. При инсулин-чувствителните пациенти заболяването се дължи на дефицит на инсулин, докато при инсулин-резистентните пациенти захарният диабет е резултат от липса на неизвестен фактор, който прави тялото нечувствително към инсулин (8). J. Lister и сътр. през 1951 г. докладват, че има „две широки групи пациенти със захарен диабет“ – групата на младите, слаби, неартериосклеротични с нормално кръвно налягане и обикновено остро начало на заболяването и по-възрастните, затлъстели, артериосклеротична група с хипертония и обикновено безсимптомно начало (9). Philip Hugh-Jones, работейки в Ямайка през 1955г., доразвива изказаното твърдение от Lawrence и Lister и въвежда термините захарен диабет тип 1 и тип 2 (10).

През 1965 г. Експертна комисия по захарен диабет публикува първия доклад на СЗО относно класификацията на заболяването (11). През 1980 г. Експертната комисия предлага 2 основни класа захарен диабет – инсулинозависим захарен диабет (ИЗЗД)/тип 1 и неинсулинозависим захарен диабет (НИЗЗД)/тип 2 (12). През годините термините ИЗЗД и НИЗЗД биват премахнати от класификациите, поради тяхната тясна насоченост към приложеното от клиницистите лечение и възрастта на съответния пациент, неразкриващи патогенезата на заболяването.

В началото на 2023 г. Американската диабетна асоциация (ADA) утвърждава следното погрешно деление на заболяването – *тип 1 захарен диабет* (вследствие на  $\beta$ -клетъчна деструкция, обичайно водеща до абсолютен инсулинов дефицит); *тип 2 захарен диабет* (дължащ се на неавтоимунна прогресивна загуба на адекватна  $\beta$ -клетъчна инсулинова секреция на фона на инсулинова резистентност и метаболитен синдром), *хбридни форми на захарен диабет* (бавно развиващ се имунно-медициран захарен диабет при възрастни /бивш LADA - Latent Autoimmune Diabetes in Adults, латентен автоимунен диабет в зряла възраст/, склонен към кетоза диабет тип 2); *специфични типове захарен диабет* (напр. моногенни синдроми – MODY /Maturity-onset diabetes of the young/, генетични дефекти в инсулиновото действие; заболявания на екзокринния панкреас – панкреатит, кистична фиброза, карцином на панкреаса, ендокринни заболявания, в т.ч. синдром на Cushing, акромегалия, лекарствено индуциран захарен диабет – при употреба на глюкокортикоиди, тиреоидни хормони, тиазиди, алфа- и бета-адренергични агонисти и т.н.), *гестационен захарен диабет* (нарушение във въглеродния толеранс, установено по време на втори или трети триместър на бременността, което не е

било регистрирано преди бременността) (Табл. 1) (13).

За да се разработят по-съвършени системи за класификация е необходим напредък в разбирането на различните етио-патогенетични пътища и механизми, водещи до хипергликемия и поява на захарен диабет. Докато класическите типове захарен диабет – тип 1 и тип 2, обикновено могат да бъдат добре разграничени клинично, има много хора с клинични и биохимични характеристики, които затрудняват типизирането на заболяването. Изясняването дали хбридните подтипове представляват отделни нозологични единици или са част от прогресиращ във времето различен спектър на нарушенията също изисква нови познания. Изследователската цел е да се изяснят етио-патогенетичните пътища, водещи до намаляване и/или загуба на  $\beta$ -клетъчната функция. Тъй като това е една обща характеристика на всички типове захарен диабет, е възможно бъдещите системи за класификация да се фокусират върху този факт, при условие че бъдат идентифицирани отличителни механизми, свързани с уникални клинични подтипове, които в крайна сметка могат да имат отношение към персонализиране на лечението. За най-точно типизиране на захарния диабет са необходими биомаркери и надеждни тестове за оценка на  $\beta$ -клетъчната маса и функция, както и за проследяване на прогресията на нарушенията и отговора към различни терапевтични интервенции.

В тази връзка обширно скандинавско клинично проучване съобщава за пет различни подтипа на захарен диабет на базата на групиране на клинични, биохимични и генетични показатели при хора с новодиагностициран захарен диабет. Така, през 2008 г. програмата ANDIS си поставя за цел да обхване всички новодиагностицирани лица със захарен диабет до 1 г. от поставянето на диагнозата в областта Скания в Южна Швеция (14). Включените в нея индивиди са над 20 000 или над 90% от новодиагностицираните пациенти. E.Ahlqvist и сътр. погрешно делят тези индивиди, използвайки следните 6 показателя – възраст, ИТМ,  $HbA_{1c}$ , наличие на анти-GAD65 антитела, оценка на бета-клетъчната функция (HOMA2-B) и инсулиновата резистентност (HOMA2-IR) (14, 15).

Получените 5 клъстера притежават специфични характеристики и прогресия.

**Клъстер 1** – тежък автоимунен диабет (SAID) обхваща 6% от възрастните индивиди в ANDIS, които обикновено се класифицират като пациенти със захарен диабет тип 1 или LADA. Този клъстер се характеризира с ранно начало на заболяването, инсулинов дефицит,

**Таблица 1.** Нова класификация на захарния диабет (по 13).

<b>Захарен диабет тип 1</b>
<b>Захарен диабет тип 2</b>
<b>Хибридни форми на захарен диабет</b> Бавно развиващ се имуномедиран диабет при възрастни Склонен към кетоза захарен диабет тип 2
<b>Други специфични типове</b> Моногенен диабет - Моногенни дефекти на $\beta$ -клетъчната функция - Моногенни дефекти в действието на инсулина Заболявания на екзокринния панкреас Ендокринни нарушения Индуциран от лекарства или химически агенти Инфекции Редки специфични форми на имуномедиран диабет Други генетични синдроми, понякога свързани с диабет
<b>Некласифициран захарен диабет</b> Тази категория трябва да се използва временно, докато се изясни етио-патогенезата на заболяването чрез целенасочени изследвания
<b>Хипергликемия, открита за първи път по време на бременност</b> Захарен диабет при бременност Гестационен захарен диабет

относително нисък ИТМ, лош метаболитен контрол (висок  $HbA_{1c}$ ) и наличие на анти-GAD65 антитела.

**Клъстер 2** – тежък инсулин-дефицитен диабет (SIDD) включва 18% от изследваните, като този тип притежава същите клинични характеристики като Клъстер 1 с една сигнификантна разлика – липсата на анти-GAD65 антитела.

**Клъстер 3 (SIRD)** – тежък инсулин-резистентен диабет, презентира 15 % от пациентите, имащи висок ИТМ и висока инсулинова резистентност (висок HOMA2-IR), но по-нисък  $HbA_{1c}$ .

**Клъстер 4 (MOD)** – лек, свързан със затлъстяване диабет, обхваща 22% от индивидите, имащи висок ИТМ, но не и инсулинова резистентност.

**Клъстер 5 (MARD)** – лек, свързан с възрастта диабет е най-голямата група от 39%, обединяваща по-възрастните пациенти със захарен диабет, без инсулинова резистентност (14-16).

Но, трябва да се подчертае, че в така предлаганата класификация се наблюдава извременно припокриване на етиопатогенезата на заболяването между отделните клъстери.

**Клъстерна класификация на захарния диабет и усложнения**

Представените субгрупи, разглеждани за дълбочено от различни научни колективи по света, доказват по-голямата честота на едни усложнения на захарния диабет в сравнение с други при описаните клъстери.

При **Клъстер 1 (SAID)** и **Клъстер 2 (SIDD)** в сравнение с другите описани групи се наблюдават значително по-високи стойности на гликиран хемоглобин ( $HbA_{1c}$ ), който е силен предиктор на кетоацидоза още при поставянето на диагнозата. Също така, индивидите от тези клъстери са с наблюдаван по-висок фрактурен риск (17), но с по-малко кардиоваскуларни усложнения, поради ниската честота на дислипидемия и обезитет.

В **Клъстер 2** най-често наблюдаваното усложнение е диабетната ретинопатия, като 23% от хората показват признаци на лека ретинопатия, скринирани дори скоро след поставянето на диагнозата (15). В Германското диабетно проучване (GDS), хората от Клъстер 2 показват също така и по-висока честота на диабетната сензомоторна полиневропатия и сърдечна автономна невропатия. По време на 5 годишното проследяване на тези пациенти, въпреки възстановяването на глюкозната хомеостаза, не се наблюдава възстановяване на функцията на

съответните нерви (18). Когато се говори за усложненията, свързани с първите два клъстера, които всъщност представляват едно инсулин-дефицитно състояние, независимо от това дали пациентите попадат в Клъстер 1 или Клъстер 2, рискът от микросъдови усложнения при пациентите тясно корелира с наличието на резидуален С-пептид, както показва едно голямо финландско популационно проучване (19). Следователно, за по-прецизното изучаване на усложненията при клъстериране на толкова хетерогенната диабетна популация вероятно ще е нужно включване на повече показатели и анализиране на техните асоциации.

В Клъстер 3 (SIRD) изследваните индивиди са с измерени най-ниски стойности на гломерулна филтрация (GFR) при поставяне на диагнозата с превалящо усложнение- хронично бъбречно заболяване, макроалбуминурия, с тенденция за прогрес до краен стадий на бъбречно увреждане (15). Инсулиновата резистентност довежда до ускорено прогресиране на хронично бъбречно заболяване (ХБЗ) по следните механизми – водно-солева задръжка, гломеруларна хипертония, хиперфилтрация и хиперурикемия. В Клъстер 3 неалкохолната мастна чернодробна болест (НАМЧБ/NAFLD) също излиза на преден план като очаквано усложнение- при изследваните лица се регистрират завишени стойности на АЛАТ и висок ИТМ. Определени научни групи изказват връзка между наличните инсулиновата резистентност и хиперинсулинемия и рискът от изява и развитие на злокачествени заболявания и деменция/болест на Алцхаймер, което прави хората от Клъстер 3 уязвими (20, 21).

При Клъстер 4 (MOD) НАМЧБ, артериалната хипертония и дислипидемия не са така застъпени както при Клъстер 3, което ни дава основание да смятаме, че повечето от хората в група 4 могат да бъдат отнесени към т.нар. относително метаболитно „по-здрав“ обезни (14).

Индивидите от Клъстер 5 (MARD) страдат превалящо от усложнения, обвързани с напредналата възраст като остеопороза и повишен риск от фрактури, когнитивни увреждания, сърдечно-съдови заболявания- сърдечна недостатъчност, атеросклероза и предсърдно мъждене (22). Основните патогенетични механизми в тази група са намаленият инсулин секреторен капацитет и инсулинова чувствителност, причинени от промяна в телесния състав- намаляване на мускулната маса с увеличение на мастната тъкан (23).

Апјапа и сътр. (24) за първи път в Индия прилагат клъстерирането на захарния диабет при 19 084 индивида със захарен диабет тип 2, използвайки следните 8 показателя – възраст,

ИТМ, обиколка на талията,  $HbA_{1c}$ , триглицериди, HDL холестерол, С-пептид – на гладно и след стимулация. Тези изследователи добавят 2 уникални само за индийската популация клъстера – *инсулин резистентен захарен диабет при обезни пациенти (IROD)* при 25,9% и комбиниран инсулин резистентен и инсулин дефицитен диабет (CIRDD) при 12,1%. Хората от клъстера на CIRDD се презентират с трудно контролируема хипергликемия и повишен риск за бъбречни и очни усложнения (24). Индийската популация бива по-податлива към развитието на захарен диабет тип 2 в сравнение с Кавказката популация. Също така, отговорът към различни групи хипогликемизиращи медикаменти бива различен – S. Gan и сътр. представят метаанализ, презентиращ по-добра ефикасност на инхибиторите на натриево-глюкозния ко-транспортър 2 (SGLT2-i) и дипептидил пептидаза – 4 (DPP-4) инхибиторите при индийската популация спрямо Кавказката (25).

L. Xing и сътр. (26) провеждат в град Шън-джън проучване при 1060 китайски пациенти като измерват 5 показателя – възраст, ИТМ,  $HbA_{1c}$ , HOMA2-B, HOMA2-IR и разделят изследваните лица в 4 клъстера (изключвайки клъстера на тежък аутоимунен диабет). Данните могат да бъдат сравнени с получените от Ahlqvist и сътр. Пациентите с тежък инсулин резистентен захарен диабет страдат в по-голяма степен от ХБЗ (57%) и периферна невропатия (67%), докато пациентите с тежък инсулин-дефицитен захарен диабет имат най-висок риск от развитие на диабетна ретинопатия (32%), албуминурия (31%) и периферна артериална болест (13%) (26).

### Терапевтичен подход според клъстерното разделение

Последните консенсусни препоръки на ADA и EASD от 2022 г. за лечение на хипергликемията при захарен диабет тип 2 се основават на холистичния подход, в центъра на който стои човекът със захарен диабет тип 2. Изборът на медикамент се базира на наличието на атеросклеротично сърдечно-съдово заболяване (ACCC3), хипогликемичен риск, странични ефекти, цена и предпочитания на пациента. На преден план изпъкват препоръките за използвана рецепторните агонисти на глюкагоно-подобния пептид-1 (GLP-1 RA) и инхибиторите на натриево-глюкозния ко-транспортър 2 (SGLT2-i) с доказани ползи при пациенти със сърдечна недостатъчност (CH), ХБЗ и установено ACCC3 или множество рисков фактори, с цел намаляване на големите сърдечно-съдови събития (MACE), а също така при тези медикаменти се дава възможност за употребата им, независимо от изходния  $HbA_{1c}$  и

базисното лечение с метформинов препарат (27).

При определянето на антидиабетна терапия е уместно да се вземат предвид инсулиновата секреция и наличието на инсулинова резистентност, което новата клъстерна класификация подпомага чрез вече изчислените HOMA2-B и HOMA2-IR при групирането на пациентите. Въпреки очертаното по-прецизно клъстерно класифициране на групите пациенти със захарен диабет тип 2, транслирането на актуалните препоръки на ADA/EASD (27) при отделните клъстери не може да бъде директно, а до известна степен е условно и дава само насоки.

При индивидите от *Клъстер 1 (SAID)* с изчерпан инсулин секреторен капацитет би следвало да бъде приложено инсулинолечение с цел превенция развитието на остра метаболитна декомпенсация – диабетна кетоацидоза. Доказано е, че ранното включване на екзогенен инсулин при хора с бавно развиващ се имунно-медиран захарен диабет при възрастни (бивш LADA) би променило и отложило прогресивната загуба на инсулин секреторния капацитет (28).

*Клъстер 2 (SIDD)* предлага по-широк спектър на избор относно прилаганите хипогликемизиращи медикаменти – СУП, глиниди, DPP-4 инхибитори биха били подходящ избор (22). Интензифицирането на терапията с базален или прандиален инсулин и GLP1 RA също има благоприятен ефект, когато инсулиновите секретагози (СУП, глиниди) са изчерпали своето действие.

Пациентите от *Клъстер 3 (SIRD)* биха имали голяма полза от спазване на правилен и стриктен хранителен и двигателен режим в комбинация с употребата на метформинови препарати поради наличната изразена инсулинова резистентност. Тиазолидиндионите биха показали благоприятен ефект върху НАМЧБ, превалиращо срещана при тези болни, но покачването на тегло като техен страничен ефект трябва да бъде взето под внимание. Прилагането на GLP1 RA и SGLT2-i подпомага редуцирането на наднормено тегло с подобряване на метаболитния контрол и съществуващата инсулинова резистентност като по този начин стават важна част от терапията. От друга страна, прилагането на инсулин,

СУП и глиниди би довело до допълнително хиперинсулинизиране на пациентите, следователно употребата им трябва да бъде ограничена при тази таргетна група (27).

Като терапия на първи избор при *Клъстер 4 (MOD)* уместна би била промяната в хранително-двигателния режим. Фармакологичната терапия е най-добре да бъде представена от метформин, GLP1 RA и SGLT2-i. Предвид наличното затлъстяване при тези индивиди използването на медикаменти, които водят до покачване на тегло, трябва да бъде лимитирано (27).

*Клъстер 5 (MARD)* представлява терапевтично предизвикателство поради многото фактори, които оказват влияние при застаряващото население. Възрастните хора страдат от остеопороза и повишен риск от фрактури, когнитивни увреждания, сърдечно-съдови заболявания – сърдечна недостатъчност, атеросклероза и предсърдно мъждене. Поради високия риск от хипогликемични епизоди, употребата на инсулин и инсулинови секретагози трябва да бъде сведена до минимум. Метформиновите препарати постигат добър гликемичен контрол без риск от хипогликемия или повишаване на тегло, но от друга страна пациентите в напреднала възраст с нарушена бъбречна или чернодробна функция и сърдечна недостатъчност имат потенциално по-висок риск от развитие на лактатна ацидоза (13). DPP-4 инхибиторите притежават малко странични ефекти и минимален риск от хипогликемия, което ги прави един от медикаментите на първи избор в терапията. Zhou и сътр. представят метаанализ за ролята на антидиабетните медикаменти върху риска от демения като DPP-4 инхибиторите притежават най-нисък риск, а инсулинът се презентира с най-висок такъв (29).

Използването на клъстерирането при класифицирането на захарния диабет би помогнало на медицинските специалисти да разделят пациентите лесно в различни групи с определени медицински характеристики, да планират лечението на съответния пациент спрямо патофизиологичните особености на наличния тип диабет, да предвиждат очакван ход на развитие на заболяването и да превентират инвалидиращите усложнения.

1. **International Diabetes Federation.** IDF Diabetes Atlas, 10th edn. *Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2021.*
2. **Stylianou C, Kelnar C.** The introduction of successful treatment of diabetes mellitus with insulin. *J R Soc Med 2009; 102(7): 298-303.*
3. **Roy CK, Ojha JK, Bajpai HS.** A review of the history of Prameha and diabetes mellitus. *Anc Sci Life 1993; 12(3-4): 394-398.*
4. **Harley G.** Diabetes: Its Various Forms and Different Treatments. *London, Walton and Maberley, 1866.*
5. **Lancereaux E.** Le diabete maigre: ses symptomes, son evolution, son pronostic et son traitement. *Un Med Paris 1880; 20: 205-211.*
6. **Lawrence RD.** The Effect of Exercise on Insulin Action in Diabetes. *Br Med J 1926; 10; 1(3406): 648-650.*
7. **Falta W, Boller R.** Insularer und insulinresistenter diabetes. *Klin Wochenschr 1931; 10: 438-443.*
8. **Himsworth HP.** Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. *Lancet 1936:127-130.*
9. **Lister J, Nash J, Ledingham U.** Constitution and insulin sensitivity in diabetes mellitus. *Br Med J 1951: 376-379.*
10. **Hugh-Jones P.** Diabetes in Jamaica. *Lancet 1955; 266: 891-897.*
11. **World Health Organization WHO. Diabetes Mellitus.** Report of a WHO Expert Committee. *Technical Report Series, 1965, 310.* WHO, Geneva.
12. **World Health Organization WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus.** Second Report. *Technical Report Series, 1980, 646.* WHO, Geneva.
13. **El Sayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, et al.** on behalf of the American Diabetes Association. Introduction and Methodology: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care 2023; 46(Suppl 1): S1-S4.*
14. **Ahlqvist E, Storm P, Käräjämäki A, Martinell M, Dorkhan M, Carlsson A, et al.** Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *Lancet Diabetes Endocrinol 2018; 6(5): 361-369.*
15. **Ahlqvist E, Prasad RB, Groop L.** Subtypes of type 2 diabetes determined from clinical parameters. *Diabetes 2020; 69(10): 2086-2093.*
16. **Dutta D, Mukhopadhyay S.** Novel diabetes subgroups. *Lancet Diabetes Endocrinol 2018; 6(6): 438.*
17. **Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB.** Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol 2007; 166(5): 495-505.*
18. **Zaharia OP, Strassburger K, Strom A, Bönhof GJ, Karusheva Y, Antoniou S, et al.** German Diabetes Study Group. Risk of diabetes-associated diseases in subgroups of patients with recent-onset diabetes: a 5-year follow-up study. *Lancet Diabetes Endocrinol 2019; 7(9): 684-694.*
19. **Harsunen M, Haukka J, Harjutsalo V, Mars N, Syreeni A, Härkönen T, et al.** Residual insulin secretion in individuals with type 1 diabetes in Finland: longitudinal and cross-sectional analyses. *Lancet Diabetes Endocrinol 2023;11(7): 465-473.*
20. **Gallagher EJ, LeRoith D.** Hyperinsulinaemia in cancer. *Nat Rev Cancer 2020; 20(11) :629-644.*
21. **Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang HY, Ahima RS, et al.** Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nat Rev Neurol 2018; 14(3): 168-181.*
22. **Tanabe H, Masuzaki H, Shimabukuro M.** Novel strategies for glycaemic control and preventing diabetic complications applying the clustering-based classification of adult-onset diabetes mellitus: A perspective. *Diabetes Res Clin Pract 2021; 180: 109067.*
23. **Al-Sofiani ME, Ganji SS, Kalyani RR.** Body composition changes in diabetes and aging. *J Diabetes Complications 2019; 33(6): 451-459.*
24. **Anjana RM, Pradeepa R, Unnikrishnan R, Tiwaskar M, Aravind SR, Saboo B, et al.** New and unique clusters of type 2 diabetes identified in Indians. *J Assoc Physicians India 2021; 69(2): 58-61.*
25. **Gan S, Dawed AY, Donnelly LA, Nair ATN, Palmer CNA, Mohan V, et al.** Efficacy of modern diabetes treatments DPP-4i, SGLT-2i, and GLP-1RA in white and asian patients with diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Diabetes Care 2020; 43(8): 1948-1957.*
26. **Xing L, Peng F, Liang Q, Dai X, Ren J, Wu H, et al.** Clinical characteristics and risk of diabetic complications in data-driven clusters among type 2 diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne) 2021;12: 617-628.*
27. **Davies MJ, Aroda VR, Collins BS, Gabbay RA, Green J, Maruthur NM, et al.** Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2022. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care 2022; 45(11): 2753-2786.*
28. **Maruyama T, Tanaka S, Shimada A, Funae O, Kasuga A, Kanatsuka A, et al.** Insulin intervention in slowly progressive insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab 2008; 93(6): 2115-2121.*
29. **Zhou JB, Tang X, Han M, Yang J, Simó R.** Impact of antidiabetic agents on dementia risk: A Bayesian network meta-analysis. *Metabolism 2020; 109: 154265.*

### Address for correspondence:

г-р Елена Бечева,

Клиника по Ендокринология и болести на  
обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“,  
Медицински Университет, Пловдив,  
ул. „Васил Априлов“, 15А, Пловдив, 4000  
e-mail: eli901@abv.bg

Dr. Elena Becheva,

Clinic of Endocrinology and Metabolic  
Diseases,  
„Sv. Georgy“ University Hospital, MU, Plovdiv,  
15A „Vasil Aprilov“ St., Plovdiv, 4000  
e-mail: eli901@abv.bg

## Парадокс на обезитета при диабетно стъпало

Гатев, Цветан Вл.<sup>1</sup>, Бялкова, Виктория В.<sup>2</sup>, Каменов, Здравко А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Катедра Вътрешни болести, Медицински факултет, Медицински университет – София, Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ Александровска, София

<sup>2</sup> Клиника по Кардиология, Национална кардиологична болница, София

### Адрес за кореспонденция:

Д-р Цветан Гатев, гм

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната,  
УМБАЛ „Александровска“, Ул. „Св. Георги Софийски“ 1,  
София 1431, България  
Email: drgatev@gmail.com

Постъпване: 12. 07. 2023

Приемане: 14. 07. 2023

### Резюме

**Контекст на проблема:** Диабетното стъпало се явява усложнение на усложненията – хроничните хипергликемични изменения в съдовете и нервите. В патогенезата му участват множество механизми, като не всички от тях са изцяло изяснени. Известно е, че индексът на телесна маса (ИТМ) корелира с метаболитните заболявания и тяхната тежест. Ролята на мастната тъкан и произвежданите от нея цитокини при диабетно стъпало е слабо проучена.

**Методи:** При срезово проучване са изследвани 120 хоспитализирани пациенти със захарен диабет тип 2, на средна възраст  $57,68 \pm 10,47$  г., в интервала между 32 и 79 г. Те са разделени в 2 групи – хора с диабетно стъпало – с налична плантарна диабетна рана на ходилото ( $n=42$ ) и такива без това усложнение ( $n=78$ ). На всички участници са направени стандартни антропометрични, физикални и лабораторни изследвания. Телесният им състав е определен чрез биоимпедансен метод.

**Резултати:** Пациентите с диабетно стъпало са значимо по-възрастни, с по-голяма давност на диабета, с по-ниски ИТМ, телесно тегло и обиколка на ханша, както и с по-малко мазнини в тялото. Броят компоненти на метаболитния синдром са значимо по-малко сред лицата с диабетни рани спрямо хората без това усложнение. Всички жени в групата с диабетно стъпало са в менопауза.

**Заключение:** В нашето проучване по-голямото количество мастна тъкан корелира с по-ниска честота на диабетното стъпало. Проявата на това усложнение се вписва в определението за „парадокс на обезитета“.

**Ключови думи:** диабетно стъпало, мастна тъкан, метаболитен синдром, парадокс на обезитета.

### Въведение

Откриването на инсулина и напредъкът в лечението на захарния диабет през последните 100 години доведе до значимо по-голяма преживяемост на хората с това заболяване (1). В резултат нарасна и честотата на свързаните хронични усложнения, сред които е и диабетното стъпало (2). То се дефинира като наличие на

инфекция, язва или деструкция на тъканите на стъпалото, асоциирани с невропатия и/или периферна артериална болест на долните крайници при човек със захарен диабет (3). Настъпването му е обременяващо събитие не само за засегнатия човек, но също и за неговите близки, обществото и здравната система като цяло. Диабетните рани са причина за значимо влошаване в качеството на живота и преждевременна смърт (4-6).

Финансовите разходи са 5 пъти по-високи за пациенти с диабетно стъпало при първа поява на диабетна рана и 2.6 пъти повече – при последващ рецидив, в сравнение с диабетик без това усложнение (7, 8). Диабетното стъпало е с многофакторна обусловеност, в чиято патогенеза участват метаболитни, съдови, неврологични, хемодинамични, механични, инфекциозни, наследствени фактори (9). Връзката на това усложнение с мастната тъкан е обект на активно проучване.

Затлъстяването е доказан рисков фактор за възникването на захарен диабет тип 2 (10). Данните за отношението на свръхтеглото към диабетното стъпало и ампутациите не са едноточни (11). През 1999 г. американски колектив въвежда идеята за „парадокс на обезитетата“, при който по-високият индекс на телесна маса се свързва с по-добра преживяемост, като за първи път е описана при лица на хемодиализа (12, 13). Впоследствие тази зависимост се установява и за други заболявания като сърдечна недостатъчност (14, 15), миокарден инфаркт (16), остър коронарен синдром (17), ХОББ (18), белодробен емболузъм (19).

Проучванията през последните няколко десетилетия разкриват ролята на мастната тъкан не само като инертен енергиен резервоар, но и като голям ендокринен орган. Произвеждащите от нея цитокини и биоактивни медиатори, наречени адипокини, участват в регулацията на апетита, метаболизма на нутриентите, инсулиновата чувствителност, възпалението, коагулацията, канцерогенезата, атеросклерозата, имунната регулация, сърдечно-съдовите заболявания, диабетните усложнения (20-22). При пациенти със затлъстяване адипоцитите са по-големи, което ги прави резистентни на свойството на инсулина да потиска липолизата, особено във висцералната или дълбоката подкожна мастна тъкан. Това води до засилено освобождаване и повишаване плазмените нива на свободните мастни киселини (СМК) и глицерола, които задълбочават инсулиновата резистентност в мускулите и черния дроб (23). Освобождаването на СМК от адипоцитите в резултат на засилената липолиза може да допринесе за инсулиновата резистентност и чрез потискане на глюкозния транспорт и фосфорилиране в клетката, последвано от намалено разграждане на глюкозата и синтеза на гликоген, повишена секреция на апополипротеин В, и повишена активност на чернодробната липаза (24). Това е свързано с промяна в секрецията на адипокини, ендотелна дисфункция и акселерация на атеросклерозата. Някои автори дефинират тази връзка като „адипо-васкуларна

метаболитна ос“, която се асоциира с повишен сърдечно-съдов риск при хората със затлъстяване и захарен диабет тип 2 (25). Изследванията за ролята на адипокините при диабетно стъпало са ограничени. Например, има данни за високи плазмени нива на интерлевкин-6, резистин, оментин-1 и ниски стойности на адипонектин при хора с диабетни рани, като тези адипокини могат да бъдат свързващ фактор в патогенезата на диабетните улцерации, съдовете и възпалителните събития (26-29). Групата на адипокините е обект на засилен научен интерес, като се откриват нови представители и тяхната роля в различни физиологични и патологични процеси.

### Материали и методи

За нашето срезово проучване бяха избрани 120 пациенти на възраст от 32 до 79 г. със захарен диабет тип 2, хоспитализирани в клиника по Ендокринология и болести на обмяната на УМБАЛ „Александровска“. Включващите критерии бяха: захарен диабет тип 2, възраст над 18 г. и подписано информирано съгласие за участие. От изследването бяха изключени хора, които имат увреждане на стъпалата, което не е свързано със захарния диабет и неговите усложнения, такива със захарен диабет тип 1, както и при наличие на обстоятелства и заболявания, които биха нарушили достоверността на получените резултати.

Проучването е одобрено от етичната комисия към Медицински университет София с протокол № 10/25. 03. 2019 г. Бяха използвани следните изследователски методи: анамнеза, физикален статус, антропометричен панел – ръст, тегло, индекс на телесна маса (ИТМ  $\text{kg}/\text{m}^2$ ), обиколка на талия и ханш, отношение талия/ханш, талия/ръст. Телесният състав беше определен с биоимпедансен метод чрез Tanita MC-780MA-N (Tanita Corporation, Tokyo, Japan) сутрин на гладно, даващ информация за следните параметри: процент мазнини (Fat %), количество мазнини в килограми (Fat mass), свободна от мазнини маса в килограми (Fat free mass - FFM), индекс на висцералната мастна тъкан (Visceral fat rating), метаболитна възраст (Metabolic age), основна обмяна (Basal metabolic rate). Допълнително бяха анализирани стандартни биохимични показатели сутрин на гладно: гликиран хемоглобин ( $\text{HbA}_{1c}$ ), АСАТ, АЛАТ, ГГТ, пикочна киселина, липиден профил (общ холестерол, HDL, LDL, VLDL, триглицериди). Изследванията бяха проведени в Централна клинична лаборатория на УМБАЛ „Александровска“.

Данните са въведени и обработени със статистическия пакет IBM SPSS Statistics v19 за

Windows. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, бе прието  $p < 0,05$ . Резултатите са представени като средна  $\pm$  стандартно отклонение (SD).

### Резултати

В изследването бяха включени 120 пациенти със захарен диабет тип 2 – 68 мъже (56,7%) и 52 жени (43,3%), със средна възраст  $57,68 \pm 10,47$  г. Те бяха разделени в 2 групи:

- Група I – пациенти със захарен диабет тип 2 без диабетно стъпало ( $n=78$ )
- Група II – пациенти със захарен диабет тип 2 и диабетно стъпало – с налична плантарна диабетна рана на ходилото ( $n=42$ ).

Основните характеристики на изследваните лица са показани в Таблица 1.

Хората с диабетно стъпало бяха по-възрастни, с по-голяма давност на диабета, с по-ниски ИТМ, телесно тегло и обиколка на ханша, както и с по-малко количество мазнини в тялото. Допълнително се установи, че всички жени в групата с диабетно стъпало бяха в менопауза, което е значимо повече спрямо лицата без това усложнение. Пациентите в двете групи бяха сходни по отношение на полово разпределение, ръст, талия, отношения талия/ханш и талия/ръст, свободна от мазнини маса, индекс на висцерална мастна тъкан, метаболитна възраст и основна обмяна (Табл. 1).

В Таблица 2 са представени данни за компонентите на метаболитния синдром и базисните биохимични показатели на изследваните лица без и с диабетно стъпало.

От получените резултати прави впечатление значимо по-големият брой компоненти на метаболитния синдром и тенденцията за по-високата му честота при хората без диабетно стъпало. Нивата на АСАТ, АЛАТ и ГГТ бяха по-ниски при хората със захарен диабет и рани. Популацията в двете групи беше сходна по отношение средните нива на фракциите от липидния профил, пикочна киселина, гликиран хемоглобин, артериално налягане и сърдечна честота в покой (Табл. 2).

На база на горепосочените антропометрични, клинични и лабораторни параметри, при които се установи статистически значима разлика между двете групи, се проведе ROC-анализ за установяване на прагови стойности за разграничаване на индивидите с диабетно стъпало сред изследваната популация (Фиг. 1-3, Табл. 3).

От представената таблица се демонстрира, че за всички параметри резултатите са сигнификантни, като с най-голяма площ под крива

та, респективно с най-висока дискриминативна способност за разграничаване на индивидите с диабетно стъпало, е давността на захарния диабет. Чрез допълнителен анализ се определи праговата стойност от  $\geq 7$  годишна давност на ЗД със 76% чувствителност и 78% специфичност при отличаване на хората с диабетно стъпало сред изследваната популация със захарен диабет. На второ място е количеството мазнини. От ROC-анализа се установи, че при прагова стойност от  $\leq 30$  кг със 73% чувствителност и 63% специфичност могат да бъдат определени пациентите с диабетно стъпало. Относно процентното съдържание мазнини в тялото праговата стойност, която беше определена, е  $\leq 34\%$  и тя има 60% чувствителност и 60% специфичност.

Допълнително за отличаващите се параметри проведохме анализ чрез бинарна логистична регресия, за да степенуваме количественото влияние на всеки от факторите за развитието на диабетно стъпало. Резултатите са представени в Таблица 4.

Еднозначно се очерта протективният ефект на по-високата телесна маса, като от различните ѝ измерения с най-голямо влияние беше съдържанието на мастна тъкан в тялото. Всяко нейно увеличение с 1% от телесния състав или с 1 кг в абсолютна стойност беше свързано с редукция на риска за развитие на диабетно стъпало съответно с 8% и 7%. В изследваната популация нарастването на ИТМ намаляваше вероятността за възникване на диабетно стъпало също със 7%, а покачването на теглото – с 3%.

### Обсъждане

Диабетното стъпало е сред най-тежките усложнения на захарния диабет, поради последствията си върху качеството на живот с трайна инвалидизация, необходимост от повече здравни грижи, финансови разходи и преждевременна смърт на засегнатите лица (4, 5).

При анализа на телесния състав се установи, че хората с диабетни рани имат значимо по-нисък ИТМ и телесно тегло, по-малка обиколка на ханша, както и по-малко общо съдържание на мазнини в тялото, в сравнение с пациентите без улцерации. Свободната от мазнини маса, индексът на висцерална мастна тъкан и метаболитната възраст бяха статистически сходни между двете групи. Увеличаването на телесната маса в контекста на наднорменото тегло и затлъстяването обикновено е асоциирано с множество неблагоприятни здравни ефекти (30).

**Таблица 1.** Основни характеристики и антропометрия на изследваната популация без и с диабетно стъпало

Показатели	Групи	Група I	
		ЗД без диабетно стъпало	ЗД с диабетно стъпало
Възраст (г.)		55,69±9,81	61,36±10,76*
Давност на ЗД (г.)		4,66±8,28	13,49±10,47*
Жени (%)		46,2	38,1
Жени в менопауза (%)		72,2	100*
ИТМ (кг/м <sup>2</sup> )		34,07±5,95	30,86±6,38*
Телесно тегло (кг)		98,76±19,79	88,26±21,03*
Ръст (см)		170,26±9,85	168,97±10,75
Талия (см)		112,61±14,44	105,85±14,53
Ханш (см)		115,35±11,46	107,0±8,12*
Талия/Ханш		0,96±0,089	0,96±0,08
Талия/Ръст		0,66±0,088	0,61±0,076
Процент мазнини (%)		37,53±8,84	29,78±11,1*
Количество мазнини (кг)		37,56±13,12	26,44±11,73*
Свободна от мазнини маса (кг)		59,76±12,10	56,53±12,64
Индекс на висцерална мастна тъкан		10,85±2,51	10,0±4,09
Метаболитна възраст (г.)		69,31±11,76	60,08±15,77
Основна обмяна (kcal)		1786,66±354,22	1665,59±296,21

\* $p < 0,05$

**Таблица 2.** Метаболитни и биохимични показатели при изследваните лица без и с диабетно стъпало

Показатели	Групи	Група I	
		ЗД без диабетно стъпало	ЗД с диабетно стъпало
Метаболитен синдром (%)		93,2	80,6
Компоненти на метаболитния синдром (брой)		3,95±1,01	3,1±0,92*
Систолно артериално налягане (mm Hg)		132,27±19,36	136,29±21,62
Диастолоно артериално налягане (mm Hg)		82,18±9,04	78,74±10,86
Сърдечна честота (удара в мин)		74,55±9,92	80,45±15,16
Артериална хипертония (%)		84,1	91,7
Общ холестерол (mmol/l)		4,98±1,42	4,77±1,83
LDL-холестерол (mmol/l)		2,88±1,10	2,80±0,98
HDL-холестерол (mmol/l)		1,08±0,29	1,17±0,35
Триглицериди (mmol/l)		2,16±1,37	1,82±0,92
Пикочна киселина (μmol/l)		360,68±96,78	349,85±100,17
АСАТ (U/l)		32,06±34,50	15,67±5,37*
АЛАТ (U/l)		28,23±27,33	16,40±7,42*
ГГТ (U/l)		51,24±46,55	34,93±26,60*
HbA <sub>1c</sub> (%)		8,71±2,24	8,39±1,93

\* $p < 0,05$

**Таблица 3.** Резултати от ROC-анализа за оценка на базисни дискриминанти при отличаване на хората с диабетно стъпало в изследваната популация

Показатели	ROC-анализ		
	Площ под кривата	95% доверителен интервал	Значимост (p)
Давност на ЗД	0,802	0,721-0,884	<0,001
Количество мазнини	0,758	0,640-0,876	0,001
% мазнини	0,703	0,569-0,838	0,008
Телесно тегло	0,667	0,550-0,784	0,005
Възраст	0,656	0,559-0,752	0,002
ИТМ	0,651	0,531-0,771	0,012

**Таблица 4.** Бинарна логистична регресия за количествена оценка влиянието на представените параметри за развитие на диабетно стъпало

Фактор	B	Ст. грешка	p	Exp(B)=OR	95% ДИ за OR	
% мазнини	-0,081	0,030	0,007	0,922	0,869	0,978
Количество мазнини	-0,076	0,025	0,003	0,927	0,882	0,974
ИТМ	-0,069	0,035	0,048	0,933	0,872	0,999
Телесно тегло	-0,029	0,012	0,017	0,972	0,949	0,0995

ДИ – доверителен интервал; p – ниво на значимост; OR – odds ratio (отношение на шансовете)

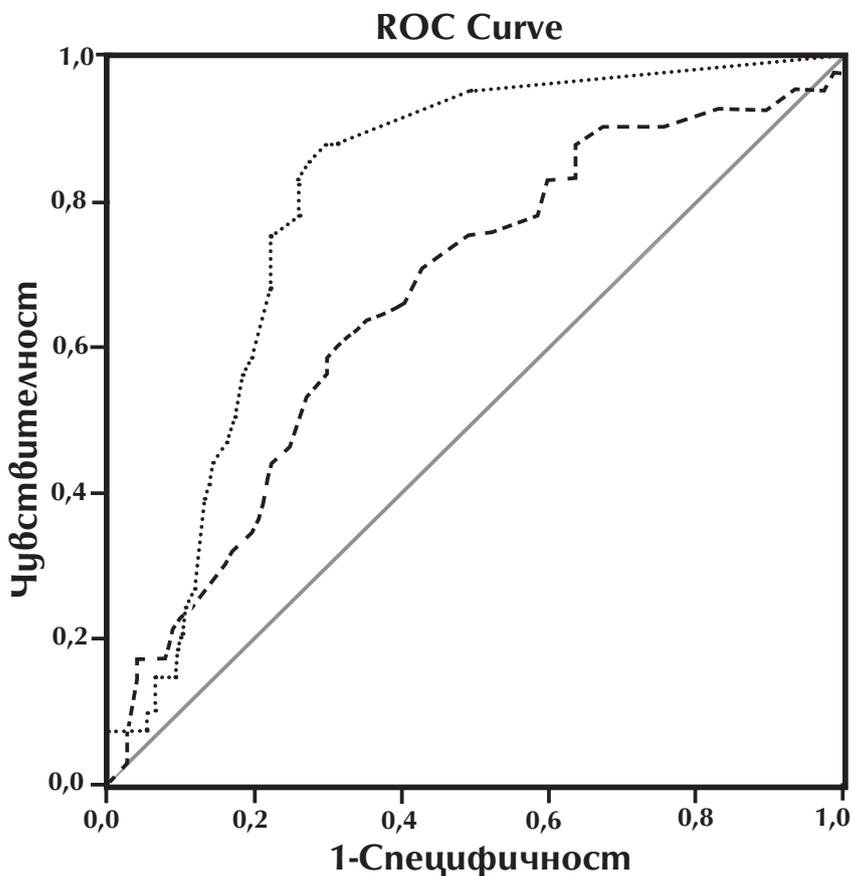
При някои състояния обаче по-високият ИТМ може да бъде протективен и се свързва с по-голяма продължителност на живота. Валидността на този „парадокс на обезитетата“ е изследвана и при хора с диабетно стъпало, като данните все още са недостатъчни и противоречиви. Pinzur и сътрудници описват, че по-високият ИТМ се свързва с по-голям риск от диабетни рани (31). В друго изследване обаче се докладва J-образна крива на улцеративния риск – както много високият, така и ниският индекс на телесна маса са неблагоприятни (32). При анализ на оперативния риск 2 големи студии посочват, че по-високият ИТМ се свързва с по-нисък риск от ампутация на долен крайник при хора със захарен диабет, но същевременно и с по-голяма честота на септични усложнения, по-дълъг болничен престой и свързани с това разходи (11, 33). При проведен анализ върху преживяемостта на над 1000 пациенти, претърпели операция на диабетно стъпало, е установена по-голяма продължителност на живота при хората с по-висок ИТМ и при такива със съхраняващи крайника малки ампутации.

Изказана е хипотезата, че неблагоприятното влияние на по-ниското тегло при пациентите с диабетно стъпало би могло да се свърже с

намалената им мускулна маса, по-лошия хранителен статус, влошения апетит, по-голямата честотата на инфекциозни усложнения, с несистемен прием на медикаментите за контрол на артериалното налягане и дислипидемията, както и с ефекта на циркулиращи фактори (като тромбосан и разтворимия тумор-некротичен фактор, които влияят на сърдечно-съдовия риск) (34).

В нашето изследване нарастването на количеството мазнини, телесното тегло и ИТМ се явяваха като значими протективни фактори за диабетно стъпало. Увеличаването с 1 на процентното съотношение на мазнините в тялото намаляваше улцеративния риск с 8%, а на ИТМ – със 7%. Вероятно тези ефекти са свързани не само с пасивните свойства на мастната тъкан, но и с отделяните от нея биологично активни молекули – адипокините. Определената прагова стойност от  $\leq 34\%$  телесни мазнини за разграничаване на хората с диабетно стъпало е със сравнително ниска чувствителност и специфичност (60%), тъй като разпределението на мастната тъкан е индивидуално при всеки човек и този показател не отразява нейния вид (бяла, кафява, бежова).

Допълнително, хората с диабетно стъпало



**Фигура 1.**

ROC-анализ за оценка дискриминативната способност на давността на ЗД и възрастта за разграничаване на хората с диабетно стъпало в изследваната популация.

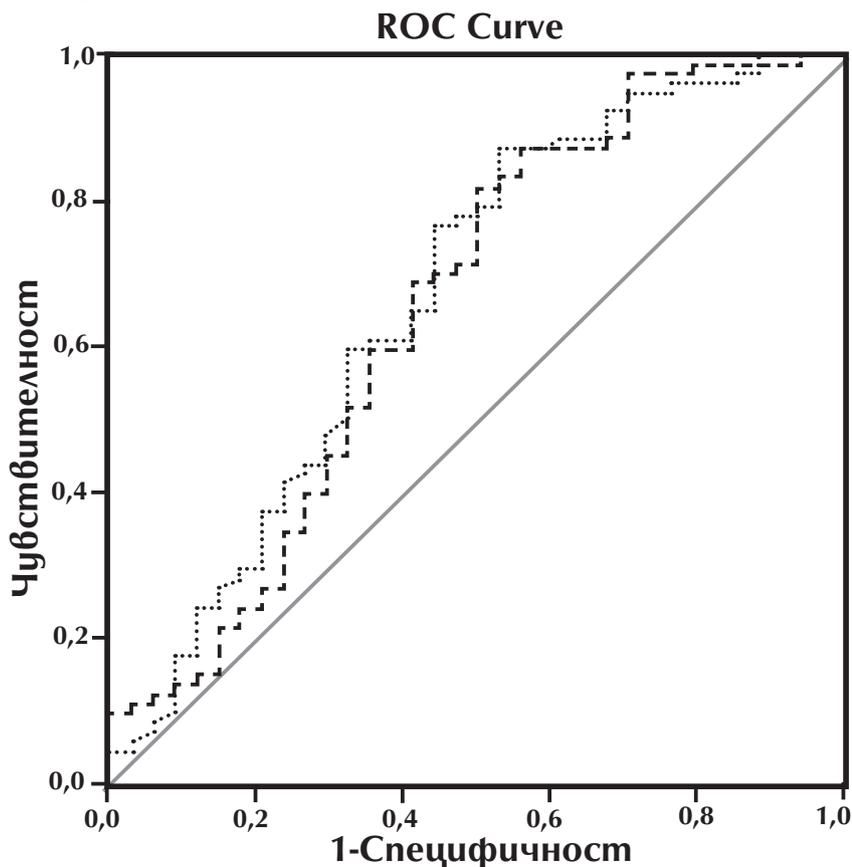
..... Давност на ЗД  
 - - - - - Възраст  
 ————— Референтна линия

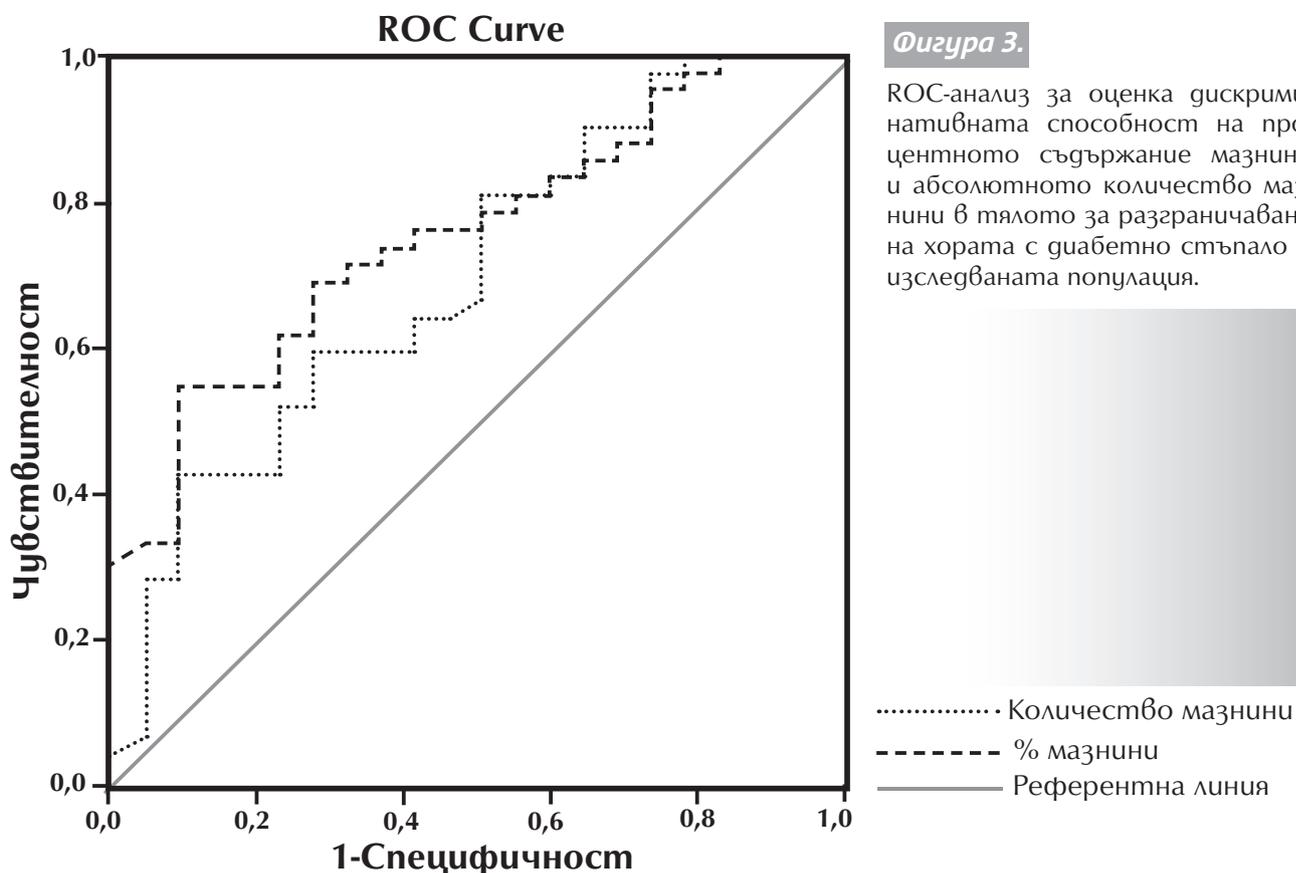
**Фигура 2.**

ROC-анализ за оценка дискриминативната способност на ИТМ и телесното тегло за разграничаване на хората с диабетно стъпало в изследваната популация.



..... ИТМ  
 - - - - - Тегло  
 ————— Референтна линия





**Фигура 3.**

ROC-анализ за оценка дискриминативната способност на процентното съдържание мазнини и абсолютното количество мазнини в тялото за разграничаване на хората с диабетно стъпало в изследваната популация.

имаха значимо по-малък брой компоненти на метаболитния синдром и по-ниски стойности на чернодробни ензими, спрямо тези без това усложнение, което може да е във връзка с разликата в ИТМ. Не е ясно дали това е част от причините или е следствие на диабетното стъпало. Въпреки „по-благоприятния“ метаболитен фон по-слабите пациенти са развили в по-голям процент диабетни рани. Tuttolomondo и сътрудници определят диабетното стъпало като сърдечно-съдов маркер (28), като те използват понятието адипо-васкуларна ос, за да подчертаят връзката на мастната тъкан със съдовата увреда при захарен диабет тип 2. Механизмите в това взаимодействие повлияват възпалението, имунната регулация, тромбообразуването, инсулиновата резистентност, хипергликемията, артериалното налягане, липидния профил, а медиаторите са различните адипокини като интерлевкин-6, резистин и адипонектин (28). Ролята на мастната тъкан – като количество, вид, разпределение и ендокринна функция, има ключово значение в патогенезата на диабетното стъпало.

### Заклучение

В изследваната популация диабетното стъпало се вписваше в концепцията за „парадокс на обезитетата“. Хората с диабетни рани имаха по-нисък ИТМ, по-малко количество мастна тъкан и по-малък брой компоненти на метаболитния синдром спрямо лицата без това усложнение. Необходими са допълнителни по-разширени изследвания за установяване на причинно-следствените връзки на тази корелация.

# Obesity Paradox in Diabetic Foot Disease

Gatev, Tsvetan V.<sup>1</sup>; Byalkova, Viktoriya V.<sup>2</sup>, Kamenov, Zdravko A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Internal Medicine, Medical University, Sofia  
Clinic of Endocrinology, University Hospital „Alexandrovska“, Sofia

<sup>2</sup> Clinic of Cardiology, National Cardiology Hospital

## Адрес за кореспонденция:

Tsvetan Gatev, MD, PhD,

Clinic of Endocrinology, University Hospital „Alexandrovska“  
1, Sv. Georgi Sofiiski Str., 1431 Sofia, Bulgaria  
Email: drgatev@gmail.com

Submitted: 12. 07. 2023

Accepted: 14. 07. 2023

## Abstract

**Background:** Diabetic foot disease is a complication of the complications due to chronic hyperglycemic changes in the vessels and nerves. Many mechanisms are involved in its pathogenesis, but not all of them are fully elucidated. Body mass index (BMI) is known to correlate with metabolic diseases and their severity. The role of adipose tissue and the cytokines that it produces in diabetic foot disease is poorly studied.

**Methods:** In a cross-sectional study 120 hospitalized patients with type 2 diabetes mellitus and mean age of  $57,68 \pm 10,47$  years, aged between 32 and 79 years, were included. They were divided into 2 groups – people with diabetic foot disease – with an existing diabetic plantar ulcer on the foot ( $n=42$ ) and those without this complication ( $n=78$ ). Standard anthropometric, physical and laboratory examinations were performed on all participants. Their body composition was determined using a bioimpedance method.

**Results:** Patients with diabetic foot were significantly older, had a longer history of diabetes, lower BMI, body weight and hip circumference, as well as having less body fat. The number of metabolic syndrome components was significantly lower among individuals with diabetic wounds, compared to those without this complication. All women in the diabetic foot group were in menopause.

**Conclusion:** In our study, higher adipose tissue content correlated with lower incidence of diabetic foot disease. The presentation of this complication fits the definition of the „obesity paradox.“

**Key words:** diabetic foot disease, adipose tissue, metabolic syndrome, obesity paradox.

## Introduction

The discovery of insulin and advances in the treatment of diabetes mellitus over the past 100 years have led to significantly longer survival of people with this disease (1). As a result, the frequency of related chronic complications increased, such as diabetic foot disease (2). The latter is defined as the presence of an infection, ulceration or tissue destruction of the foot, associated with neuropathy

and/or peripheral arterial disease of the lower extremities in a person with diabetes mellitus (3). Its occurrence is a burdensome event not only for the affected person, but also for the relatives, society and the health insurance system as a whole. Diabetic wounds are a cause of significant deterioration in quality of life and premature death (4-6). The financial costs are 5 times higher for patients with diabetic foot at the first occurrence of a diabetic wound and 2.6 times higher at a subsequent event,

compared to a diabetic person without this complication (7, 8). Diabetic foot is with multifactorial pathogenesis, which involves metabolic, vascular, neurological, hemodynamic, mechanical, infectious and hereditary factors (9). The relationship of this complication with the adipose tissue is under active investigation.

Obesity is a proven risk factor for type 2 diabetes (10). Data on the relation of overweight to diabetic foot and amputations are not unidirectional (11). In 1999, an American scientific team introduced the idea of the „obesity paradox“, in which a higher body mass index was associated with better survival, first described in hemodialysis subjects (12, 13). Subsequently, this correlation was also established for other diseases such as heart failure (14, 15), myocardial infarction (16), acute coronary syndrome (17), COPD (18) and pulmonary embolism (19).

Studies over the past few decades have revealed the role of adipose tissue not only as an inert energy storage, but also as a major endocrine organ. Cytokines and bioactive mediators, called adipokines produced by it, are involved in appetite regulation, nutrient metabolism, insulin sensitivity, inflammation, coagulation, carcinogenesis, atherosclerosis, immune regulation, cardiovascular diseases and diabetic complications (20-22). In obese patients, adipocytes are larger, making them resistant to the lipolysis-suppressing effect of insulin, especially in visceral or deep subcutaneous adipose tissue. This leads to enhanced release and increase in plasma levels of free fatty acids (FFA) and glycerol, which exacerbates insulin resistance in muscles and liver (23). Release of FFA from adipocytes as a result of enhanced lipolysis may also contribute to insulin resistance by suppressing glucose transport and its phosphorylation in the cell, followed by reduced glucose breakdown and glycogen synthesis, increased apolipoprotein B secretion and increased hepatic lipase activity (24). This is associated with a change in the secretion of adipokines, endothelial dysfunction and acceleration of atherosclerosis. Some authors define this relationship as the „adipo-vascular metabolic axis“, which is associated with increased cardiovascular risk in people with obesity and type 2 diabetes (25). Researches on the role of adipokines in diabetic foot are limited. For example, there is evidence of high plasma levels of interleukin-6, resistin, omentin-1 and low values of adiponectin in people with diabetic wounds, as these adipokines might be a linking factor in the pathogenesis of diabetic ulcerations, vascular and inflammatory events (26-29). The group of adipokines is a subject of increased scientific interest, as new representatives are discovered and their role in various physiological and pathological processes.

## Materials and methods

For our cross-sectional study 120 patients, aged 32 to 79 years, with type 2 diabetes mellitus, hospitalized in the Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases of University hospital „Alexandrovska“ were selected. Inclusion criteria were: type 2 diabetes mellitus, age over 18 years and signed informed consent for participation. People who had foot damage unrelated to diabetes and its complications, those with type 1 diabetes, and those with circumstances and illnesses that would compromise the reliability of the results were excluded from the study. The study was approved by the ethics committee of the Medical University of Sofia with protocol No. 10/25. 03. 2019. The following research methods were used: anamnesis, physical examination, anthropometric panel – height, weight, body mass index (BMI kg/m<sup>2</sup>), waist and hip circumference, waist/hip ratio, waist/stature ratio. Body composition was determined by the bioimpedance method using Tanita MC-780MA-N (Tanita Corporation, Tokyo, Japan) in the morning fasting, giving following parameters: Fat percentage (Fat %), Fat mass, Fat Free Mass – FFM, Visceral Fat Rating, Metabolic Age, Basal Metabolic Rate. Additionally, standard biochemical parameters were analyzed in the morning on an empty stomach: glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), AST, ALT, GGT, uric acid, lipid profile (total cholesterol, HDL, LDL, VLDL, triglycerides). The tests were carried out in the Central Clinical Laboratory of the University Hospital „Alexandrovska“.

Data were entered and processed with the statistical package IBM SPSS Statistics v19 for Windows. A significance level at which the null hypothesis is rejected was  $p < 0,05$ . Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

## Results

In our study 120 patients with type 2 diabetes mellitus were included – 68 men (56,7%) and 52 women (43,3%), with an average age of  $57,68 \pm 10,47$  years. They were divided into 2 groups:

- Group I – patients with type 2 diabetes without diabetic foot disease (n=78)
- Group II – patients with type 2 diabetes and diabetic foot disease – with a diabetic plantar ulcer on the foot (n=42).

The main characteristics of the studied subjects are shown in *Table 1*.

People with diabetic foot were older, had a longer duration of diabetes, lower BMI, body weight and hip circumference, as well as having less body fat. Additionally, all women in the diabetic foot

group were found to be menopausal, which was significantly more than those without this complication. Patients in the two groups were similar in terms of sex distribution, height, waist, waist/hip and waist/stature ratios, fat free mass, visceral adipose tissue index, metabolic age and basal metabolic rate.

Table 2 presents data on the components of the metabolic syndrome and the basic biochemical parameters of the subjects with and without diabetic foot disease.

From the obtained results, it is interesting to find that the number of metabolic syndrome components was significantly greater and there was a tendency towards its higher prevalence in people without diabetic foot disease. AST, ALT and GGT levels were lower in people with diabetes mellitus and foot ulcers. The population in the two groups was similar regarding mean levels of lipid profile fractions, uric acid, glycated hemoglobin, blood pressure and resting heart rate.

Based on the above mentioned anthropometric, clinical and laboratory parameters, which were statistically different between the two groups, a ROC-analysis was performed to establish threshold values for distinguishing individuals with diabetic foot among the studied population (Figure 1, 2, 3 and Table 3).

From the presented table it is demonstrated that for all parameters the results were statistically significant. The largest area under the curve, respectively the highest discriminative ability to distinguish individuals with diabetic foot, had the duration of diabetes. Through an additional analysis, the threshold value of  $\geq 7$  years of diabetes duration was determined with 76% sensitivity and 78% specificity in distinguishing people with diabetic foot among the study population. In second place was fat mass. From the ROC-analysis, it was found that by the threshold value of  $\leq 30$ kg with 73% sensitivity and 63% specificity, patients with diabetic foot could be determined. Regarding body fat percentage, the threshold value that was determined was  $\leq 34\%$  and it had 60% sensitivity and 60% specificity.

In addition, we performed a binary logistic regression analysis to assess the quantitative influence of each factor on the development of diabetic foot. The results are presented in Table 4.

The protective effect of higher body mass was clearly outlined, and among its various measurements, fat content in the body had the greatest influence. Each 1% increase in body fat or 1 kg in absolute value was associated with a 8% and 7% reduction in the ulcerative risk, respectively. In the study population, an increase in BMI also reduced the probability of diabetic foot occurrence by 7%, and an increase in weight by 3%.

## Discussion

Diabetic foot disease is among the most severe complications of diabetes mellitus, due to its consequences on the quality of life with permanent disability, the need for more health care, financial costs and premature death of the affected individuals (4, 5).

Body composition analysis found that people with diabetic ulcers had significantly lower BMI and body weight, smaller hip circumference and less total body fat, compared to patients without ulcers. Fat-free mass, visceral fat ratio and metabolic age were statistically similar between the two groups. Increased body mass in the context of overweight and obesity is commonly associated with multiple adverse health effects (30). However, in some conditions, a higher BMI might be protective and is associated with longer life expectancy. The validity of this „obesity paradox“ has also been investigated in people with diabetic foot, but the data are still insufficient and conflicting. Pinzur et al. reported that higher BMI was associated with a greater risk of diabetic ulcers (31). However, another study reported a J-shaped ulcer/risk curve – both very high and very low BMI were unfavorable (32). Regarding the amputation risk, 2 large studies indicated that higher BMI was associated with a smaller risk of lower limb amputations in people with diabetes mellitus, but also with a higher incidence of septic complications, longer hospital stay and related costs (11, 33). A survival analysis of more than 1000 patients who underwent diabetic foot surgery found longer life expectancy in those with a higher BMI and those with limb-sparing minor amputations. It has been hypothesized that the adverse effect of lower weight in patients with diabetic foot could be associated with their reduced muscle mass, worse nutritional status, decreased appetite, greater frequency of infectious complications and non-systemic medication intake for control of blood pressure and dyslipidemia, as well as the effect of circulating factors (such as thromboxane and soluble tumor necrosis factor, which influence cardiovascular risk) (34).

In our study, increased body fat, body weight and BMI appeared to be significant protective factors for diabetic foot. A 1-point increase in body fat percentage reduced ulcerative risk by 8% and increase in BMI by 7%, respectively. Probably, these effects are related not only with the inert properties of the adipose tissue, but are also due to the biologically active molecules released from it – adipokines. The determined threshold value of  $\leq 34\%$  body fat which distinguished people with diabetic foot had relatively low sensitivity and specificity (60%), prob-

**Table 1.** Main characteristics and anthropometry of the studied subjects with and without diabetic foot disease

Parameters	Groups	Group I DM without diabetic foot	Group II DM with diabetic foot
Age (y)		55,69±9,81	61,36±10,76*
Diabetes duration (y)		4,66±8,28	13,49±10,47*
Women (%)		46,2	38,1
Women in menopause (%)		72,2	100*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )		34,07±5,95	30,86±6,38*
Weight (kg)		98,76±19,79	88,26±21,03*
Height (cm)		170,26±9,85	168,97±10,75
Waist (cm)		112,61±14,44	105,85±14,53
Hip (cm)		115,35±11,46	107,0±8,12*
Waist/Hip ratio		0,96±0,089	0,96±0,08
Waist/Stature ratio		0,66±0,088	0,61±0,076
Fat percent (%)		37,53±8,84	29,78±11,1*
Fat mass (kg)		37,56±13,12	26,44±11,73*
Fat free mass (kg)		59,76±12,10	56,53±12,64
Visceral fat ratio		10,85±2,51	10,0±4,09
Metabolic age (years)		69,31±11,76	60,08±15,77
Basal metabolic rate (kcal)		1786,66±354,22	1665,59±296,21

\**p*<0,05**Table 2.** Metabolic and biochemical parameters in studied subjects with and without diabetic foot

Parameters	Groups	Group I DM without diabetic foot	Group II DM with diabetic foot
Metabolic syndrome (%)		93,2	80,6
Components of metabolic syndrome (number)		3,95±1,01	3,1±0,92*
Systolic blood pressure (mm Hg)		132,27±19,36	136,29±21,62
Diastolic blood pressure (mm Hg)		82,18±9,04	78,74±10,86
Heart rate (per min)		74,55±9,92	80,45±15,16
Arterial hypertension (%)		84,1	91,7
Total cholesterol (mmol/l)		4,98±1,42	4,77±1,83
LDL (mmol/l)		2,88±1,10	2,80±0,98
HDL (mmol/l)		1,08±0,29	1,17±0,35
Triglycerides (mmol/l)		2,16±1,37	1,82±0,92
Uric acid (µmol/l)		360,68±96,78	349,85±100,17
AST (U/l)		32,06±34,50	15,67±5,37*
ALT (U/l)		28,23±27,33	16,40±7,42*
GGT (U/l)		51,24±46,55	34,93±26,60*
HbA <sub>1c</sub> (%)		8,71±2,24	8,39±1,93

\**p*<0,05

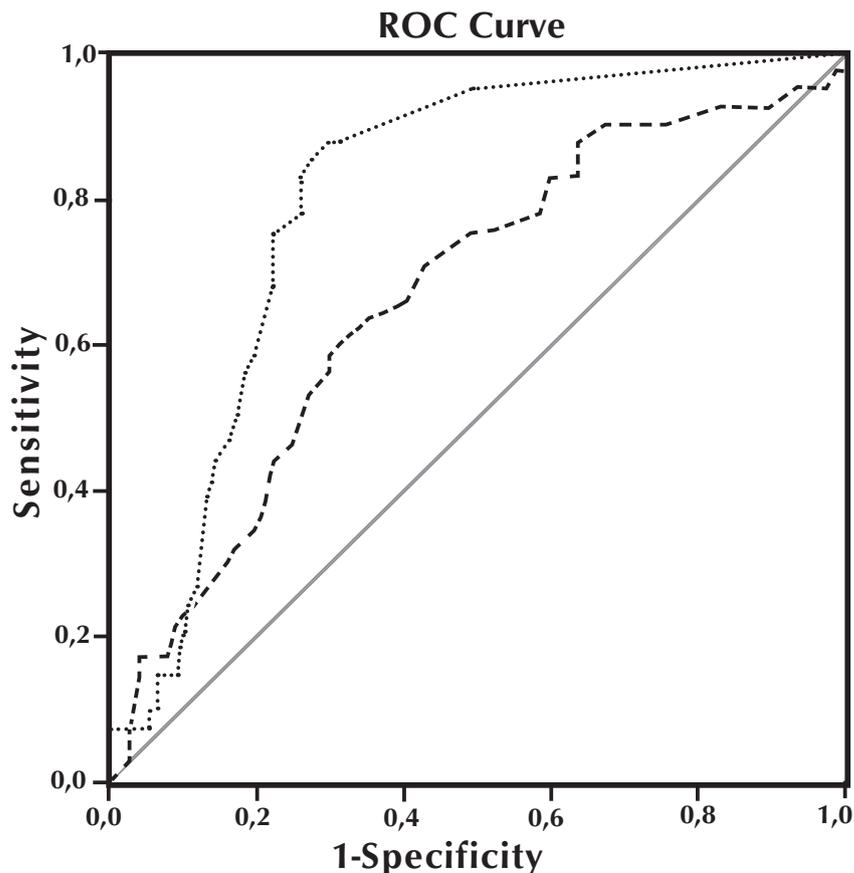
**Table 3.** Results of ROC-analysis for the evaluation of general characteristics in distinguishing people with diabetic foot in the study population

Parameters	ROC-analysis		
	Area under the curve	95% confidence interval	Significance (p)
Diabetes duration	0,802	0,721-0,884	<0,001
Fat mass	0,758	0,640-0,876	0,001
Fat %	0,703	0,569-0,838	0,008
Weight	0,667	0,550-0,784	0,005
Weight	0,656	0,559-0,752	0,002
Weight	0,651	0,531-0,771	0,012

**Table 4.** Binary logistic regression to quantify the influence of the presented parameters on the development of diabetic foot disease

Factor	B	Stat. error	p	Exp(B)=OR	95% CI of OR	
Fat %	-0,081	0,030	0,007	0,922	0,869	0,978
Fat mass	-0,076	0,025	0,003	0,927	0,882	0,974
BMI	-0,069	0,035	0,048	0,933	0,872	0,999
Weight	-0,029	0,012	0,017	0,972	0,949	0,0995

CI – confidence interval; p – level of significance; OR – odds ratio



**Figure 1.**

ROC-analysis to assess the discriminative ability of diabetes duration and age to distinguish people with diabetic foot in the study population

..... Diabetes Duration  
 - - - - - Age  
 ——— Reference Line

Figure 2.

ROC-analysis to assess the discriminative ability of BMI and weight to distinguish people with diabetic foot in the study population



..... BMI  
- - - - - Weight  
— Reference Line

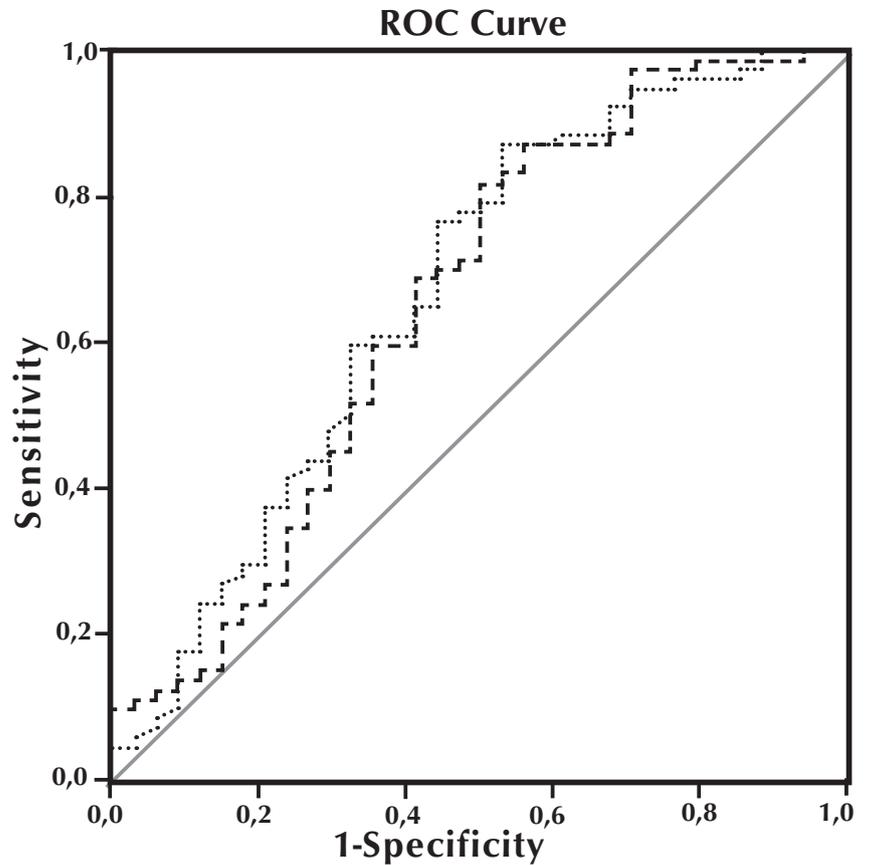
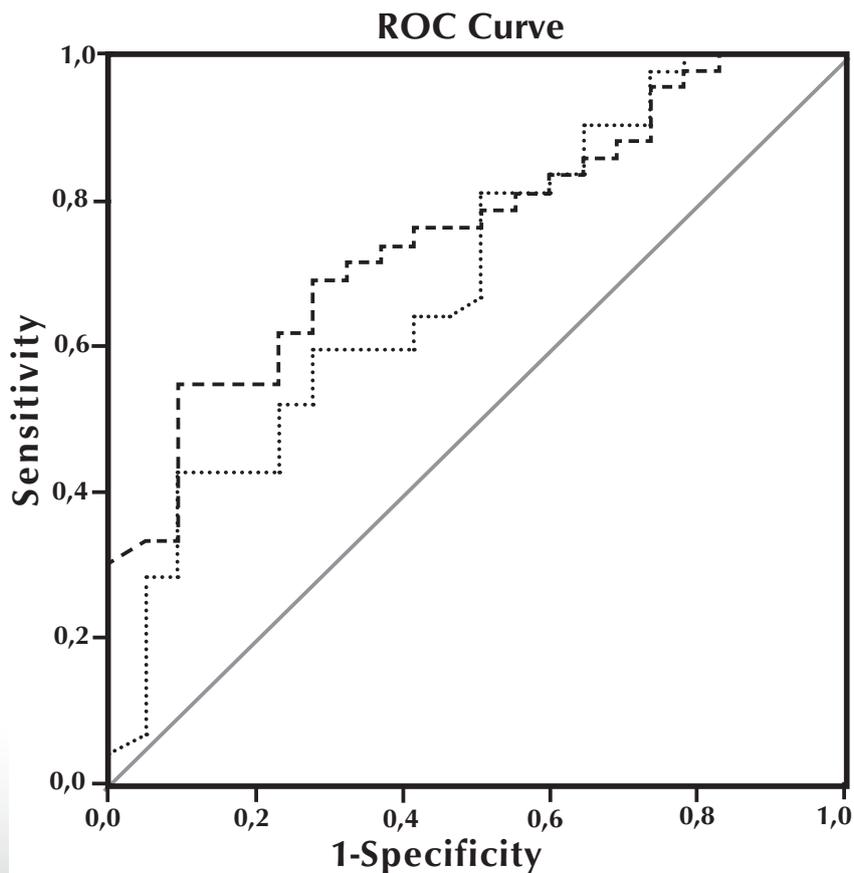


Figure 3.

ROC-analysis to assess the discriminative ability of fat mass and fat percentage to distinguish people with diabetic foot in the study population



..... Fat Mass  
- - - - - Fat Percent  
— Reference Line



ably because the distribution of adipose tissue is individual in each person and this indicator does not reflect its type (white, brown, beige).

In addition, people with diabetic foot had significantly fewer components of the metabolic syndrome and lower liver enzyme values than those without this complication, which might be related to the difference in body mass index. It is unclear whether this is part of the cause or a consequence of diabetic foot. Despite the „more favorable“ metabolic background, leaner patients had a higher percentage of diabetic wounds. Tuttolomondo and colleagues defined diabetic foot disease as a cardiovascular marker (28), using the concept of the adipo-vascular axis to emphasize the relationship of adipose tissue to vascular damage in type 2 diabetes mellitus. The mechanisms in this interaction affect inflammation, immune regulation, thrombus

formation, insulin resistance, hyperglycemia, arterial pressure, lipid profile, as the mediators are various adipokines such as interleukin-6, resistin and adiponectin (28). The role of adipose tissue – in the aspect of its quantity, type, distribution and endocrine function – is of key importance in the pathogenesis of diabetic foot disease.

## Conclusion

In the study population, diabetic foot fits the concept of the „obesity paradox“. Individuals with diabetic wounds had a lower BMI, less body fat and fewer components of the metabolic syndrome, compared to individuals without this complication. Further more extensive studies are needed to establish the causal relationships of this correlation.

## References

1. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2022; 183: 109-119.
2. Liu Y, Ning X, Zhang L, Long J, Liang R, Peng S, et al. Prevalence of long-term complications in inpatients with diabetes mellitus in China: a nationwide tertiary hospital-based study. *BMJ Open Diabetes Res Care* 2022; 10(3).
3. van Netten JJ, Bus SA, Apelqvist J, Lipsky BA, Hinchliffe RJ, Game F, et al. Definitions and criteria for diabetic foot disease. *Diabetes Metab Res Rev* 2020; 36 Suppl 1: e3268.
4. Sothornwit J, Srisawasdi G, Suwannakin A, Sriwijitkamol A. Decreased health-related quality of life in patients with diabetic foot problems. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2018; 11: 35-43.
5. Robbins JM, Strauss G, Aron D, Long J, Kuba J, Kaplan Y. Mortality rates and diabetic foot ulcers: is it time to communicate mortality risk to patients with diabetic foot ulceration? *J Am Podiatr Med Assoc* 2008; 98(6): 489-493.
6. Mouluk PK, Mtonga R, Gill GV. Amputation and mortality in new-onset diabetic foot ulcers stratified by etiology. *Diabetes Care* 2003; 26(2): 491-494.
7. Cavanagh P, Attinger C, Abbas Z, Bal A, Rojas N, Xu ZR. Cost of treating diabetic foot ulcers in five different countries. *Diabetes Metab Res Rev* 2012; 28 Suppl 1:107- 111.
8. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA* 2005; 293(2): 217-228.
9. Bandyk DF. The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment. *Semin Vasc Surg* 2018; 31(2-4): 43-48.
10. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; 444 (7121): 840-846.
11. Harris CM, Abougergi MS, Wright SM. Clinical outcomes among morbidly obese patients hospitalized with diabetic foot complications. *Clin Obes* 2019; 9(1): e12285.
12. Fleischmann E, Teal N, Dudley J, May W, Bower JD, Salahudeen AK. Influence of excess weight on mortality and hospital stay in 1346 hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999; 55(4): 1560-1567.
13. Schmidt DS, Salahudeen AK. Obesity-survival paradox-still a controversy? *Semin Dial* 2007; 20(6): 486-492.
14. Sharma A, Lavie CJ, Borer JS, Vallakati A, Goel S, Lopez-Jimenez F, et al. Meta-analysis of the relation of body mass index to all-cause and cardiovascular mortality and hospitalization in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2015; 115(10): 142814-34.
15. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347(5): 305-313.
16. Wang L, Liu W, He X, Chen Y, Lu J, Liu K, et al. Association of overweight and obesity with patient mortality after acute myocardial infarction: a meta-analysis of prospective studies. *Int J Obes (Lond)* 2016; 40(2): 220-228.
17. Niedziela J, Hudzik B, Niedziela N, Gąsior M, Gierlotka M, Wasilewski J, et al. The obesity paradox in acute coronary syndrome: a meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 2014; 29(11): 801-812.
18. Cao C, Wang R, Wang J, Bunjhoo H, Xu Y, Xiong W. Body mass index and mortality in chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *PLoS One* 2012; 7(8): e43892.
19. Stein PD, Matta F, Goldman J. Obesity and pulmonary embolism: the mounting evidence of risk and the mortality paradox. *Thromb Res* 2011; 128(6): 518-523.

20. **Coelho M, Oliveira T, Fernandes R.** Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci* 2013; 9(2): 191-200.
21. **Fantuzzi G, Mazzone T.** Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(5): 996-1003.
22. **Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster M.** Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2015; 21(1): 57-74.
23. **Boden G.** Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997; 46(1): 3-10.
24. **Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD.** Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 1996; 97(11): 2601-2610.
25. **Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, et al.** Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* 2002; 277(40): 37487-37491.
26. **Gatev T, Byalkova V, Poromanski I, Velikova T, Vassilev D, Kamenov Z.** Omentin-1 and diabetic foot. *Int J Low Extrem Wounds* 2022; 15347346211069813.
27. **Tuttolomondo A, La Placa S, Di Raimondo D, Bellia C, Caruso A, Lo Sasso B, et al.** Adiponectin, resistin and IL-6 plasma levels in subjects with diabetic foot and possible correlations with clinical variables and cardiovascular co-morbidity. *Cardiovasc Diabetol* 2010; 9: 50.
28. **Tuttolomondo A, Maida C, Pinto A.** Diabetic foot syndrome as a possible cardiovascular marker in diabetic patients. *J Diabetes Res* 2015; 2015: 268390.
29. **Tuttolomondo A, Maida C, Pinto A.** Diabetic foot syndrome: Immune-inflammatory features as possible cardiovascular markers in diabetes. *World J Orthop* 2015; 6(1): 62-76.
30. **Haslam DW, James WP.** Obesity. *Lancet* 2005; 366(9492): 1197-1209.
31. **Pinzur M, Freeland R, Juknelis D.** The association between body mass index and foot disorders in diabetic patients. *Foot Ankle Int* 2005; 26(5) :375-377.
32. **Sohn MW, Budiman-Mak E, Lee TA, Oh E, Stuck RM.** Significant J-shaped association between body mass index (BMI) and diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev* 2011; 27(4): 402-409.
33. **Sohn MW, Budiman-Mak E, Oh EH, Park MS, Stuck RM, Stone NJ, et al.** Obesity paradox in amputation risk among nonelderly diabetic men. *Obesity (Silver Spring)* 2012; 20(2): 460-462.
34. **Lin CW, Hsu BR, Tsai JS, Yang HM, Lin JR, Lin CH, et al.** Effect of limb preservation status and body mass index on the survival of patients with limb-threatening diabetic foot ulcers. *J Diabetes Complications* 2017; 31(1): 180-185.

# www.endotext.org

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

# Влияе ли гликемичният контрол върху показателите на хипоталамо-хипофизо-гонадна ос при жени със захарен диабет тип 1

Илиева-Герова, Мария И.<sup>1</sup>, Орбецова, Мария М.<sup>1</sup>, Райчева, Ралица Д.<sup>2</sup>, Денева, Таня И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, Катедра по Ендокринология, МФ,

<sup>2</sup> Катедра Социална Медицина и Обществено здраве, ФОЗ,

<sup>3</sup> 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: 13. 07. 2023

Приемане: 19. 07. 2023

## Резюме

**Въведение:** Репродуктивната функция е жизнено важна за индивида и зависи от фините механизми на регулация и взаимодействие между хипоталамуса, хипофизата и гонадите, обединени в т. нар. хипоталамо-хипофизо-гонадна ос (ХХГ) ос. Добре известна и отдавна потвърдена, първоначално при животни, а в последствие и при хора, е връзката между метаболитните и репродуктивни процеси. При пациентите със захарен диабет тип 1 (ЗДт1) етиопатогенезата, прилаганото инсулинолечение, периодичният мониторинг и корекция на метаболитния контрол самостоятелно или в комбинация оказват влияние върху показателите на ХХГ ос и допринасят за някои от наблюдаваните отклонения при жените в репродуктивна възраст.

**Цел на проучването:** Оценка на взаимовръзката между гликемичния контрол и показателите на ХХГ ос при жени със ЗДт1 в репродуктивна възраст.

**Материали и методи:** Проучването обхваща 37 жени със ЗДт1 и 83 клинично здрави жени, служещи за контролна група. Снета е подробна анамнеза по отношение давност на заболяването, обща дневна доза инсулин (ОДД), доза на килограм телесно тегло инсулин (доза/кг). При всички участнички са изследвани антропометрични и някои биохимични показатели – кръвна захар на гладно (FBG), гликиран хемоглобин ( $HbA_{1c}$ ), микроалбуминурия (U-ALB), урея (Urea), креатинин (CREA), пикочна киселина (UR AC), общ холестерол (TC), ХДЛ холестерол (HDL-C), триглицериди (TG), както и базални нива на лутеинизиращ хормон (LH), фоликулостимулиращ хормон (FSH), естрадиол (E2), тестостерон (T), полови-хормони свързващ глобулин (SHBG), дехидроепиандростерон сулфат (DHEA-S), андростендион (A4), Анти-Мюлеров хормон (AMH), пролактин (Prl), тиреостимулиращ хормон (TSH), адренкортикотропен хормон (ACTH), сутрешен кортизол (corisol 8h), 17- хидроксипрогестерон (17-OHPG). Изчислени са ИТМ, талия/ръст (Т/Р), талия/ханш (Т/Х), отношение LH/FSH, свободен андрогенен индекс (FAI), калкулиран свободен (сFT) и бионаличен тестостерон (BioT).

**Резултати:** В групата ЗДт1 са сигнификантно по-високи спрямо контролната група нивата на LH (U=953,50, p=0,001) и съотношението LH/FSH (U=953, p=0,001), както и T (U=706, p=0,000), FAI (U=940, p=0,003), сFT (U=897, p=0,043), BioT (U=837,50, p=0,024) и A4 (U=480,50, p=0,004). Жените със ЗДт1 са със статистически значимо по-високи нива и на AMH (U=465,50, p=0,040) спрямо здравите

контроли. След подразделяне на групата на диабетичките на две подгрупи спрямо нива на гликиран хемоглобин  $HbA_{1c} </\geq 7,0\%$  се запазват завишените нива на LH (8,32;4,92,  $U=244$ ,  $p=0,002$ ) и отношение LH/FSH (1,10;1,05,  $U=217$ ,  $p=0,030$ ) само в подгрупата с  $HbA_{1c} \geq 7,0\%$  при съпоставими нива за останалите показатели: FSH ( $U=153,50$ ,  $p=0,911$ ), E2 ( $U=136$ ,  $p=0,666$ ), T ( $U=144,50$ ,  $p=0,860$ ), SHBG ( $U=137$ ,  $p=0,689$ ), DHEA-S ( $U=147$ ,  $p=0,936$ ), A4 ( $U=134,50$ ,  $p=0,620$ ), 17ОНРГ ( $U=137$ ,  $p=0,689$ ), AMH ( $U=121,50$ ,  $p=0,360$ ), АСТН ( $U=186,50$ ,  $p=0,156$ ) и сутрешен кортизол ( $U=181$ ,  $p=0,142$ ). Изчислените FAI ( $U=161$ ,  $p=0,737$ ), cFT ( $U=143$ ,  $p=0,835$ ), BioT ( $U=147$ ,  $p=0,934$ ) са сходни между двете подгрупи. Налице са нормопрولاктинемия и еутиреоидина функция при всички участнички.

**Заклучение:** Жените със ЗДм1 в репродуктивно активна възраст показват по-високи нива на всички изследвани показатели на хиперандрогенизъм спрямо съответните по възраст здрави контроли, като при тези с влошен метаболитен контрол –  $HbA_{1c} \geq 7,0\%$  се запазват по-високи нива на LH и отношение LH/FSH спрямо подгрупата с  $HbA_{1c} < 7,0\%$ , но няма значими разлики в останалите показатели на ХХГ ос, както и допълнително изследваните хормони.

**Ключови думи:** захарен диабет тип 1, гликиран хемоглобин, метаболитен контрол, ХХГ ос.

### Въведение

Преди въвеждането на инсулина при пациентите със ЗДм1 се наблюдават тежък хипогонадизъм и понижен фертилитет (1). С възможностите на заместителната терапия, репродуктивните нарушения могат значимо да се повлияят. Благодарение на лечението с инсулин фертилитетът и менструалните нарушения при жени със ЗДм1 значително се подобряват, макар да персистират някои отклонения (1). Наблюдаваните основни нарушения при жени със ЗД тип 1, могат да се обобщят, както следва (2):

1. Хипоталамична ановулация/аменорея;
2. Скъсен репродуктивен период – по-късно менархе и по-ранна менопауза;
3. Менструални нарушения (олигоменорея/аменорея, полименорея);
4. PCOS подобен фенотип – хиперандрогенизъм и ановулация в хода на лечение с инсулин;
5. Автоимунни нарушения – повишена честота на овариални антители в сравнение със здрави контроли. Въпросът до колко гликемичният контрол и инсулиноterapia повлияват тези нарушения не е намерил своя категоричен отговор в световната литература.

Откриването на инсулина и приложението му при пациенти със ЗДм1 е революционно събитие и води до спасяването на милиони животи. Но инсулиноterapia осигурява на пациентите много повече. През 40-те години на миналия век честотата на хипогонадотропен хипогонадизъм при жените със ЗДм1 достига до 90% (3), постепенно бележи спад в годините напред до 30% (4), достигайки до 8,2% аменорея през 90-те години на миналия век (5). Въвеждането на инсулинови аналози, употребата на инсулинови помпи е доказало подобряване в нивата на гликирания хемоглобин и цялостно оптимизиране на

гликемичния контрол (6). Особено осезаемо е подобрието при деца, пограстващи и млади хора със ЗДм1 в последните декади (7). Подобряването на гликемичния контрол е безспорно превантивно по отношение на честота и тежестта на дългосрочните усложнения от ЗДм1, а именно пролиферативна ретинопатия, нефропатия, сърдечно-съдови (СС) заболявания (8).

До колко ЗДм1, при който водеща е инсулинопенията, оказва влияние върху ХХГ ос е обект на активно научно изследване. При плъхове парентералното въвеждане на стрептозотоцин (STZ), индуциращ тежка инсулинопения и наподобяващ лошо контролиран ЗД, предизвиква и при гвата пола хипогонадотропен хипогонадизъм, с ниски нива на гонадотропините и половите стероиди, намалена LH пулсативност и нарушена обратна връзка (9). При женските плъхове се наблюдава забавен или липсващ преовулаторен LH пик и ановулация, като нарушенията са отчасти обратими след краткотрайно лечение с инсулин (10).

Каква е обаче връзката между гликемичния контрол и промените в хормоналните показатели на ХХГ ос при жени със ЗДм1? При физиологични условия, когато панкреасът секретира инсулин в порталната циркулация, черният гроб е органът, изложен на най-високи инсулинови концентрации и елиминира значителна част от секретирания инсулин (11). При пациентите със ЗДм1 подкожно приложеният инсулин се поема от системната циркулация, пропускайки first pass ефекта на черния гроб и излага периферните тъкани на повишени дози инсулин (12). Подгържането на оптимален гликемичен контрол и прилагането на интензифицирана инсулиноterapia с цел предпазване от развитие на хронични усложнения на заболяването понякога изисква супрафизиологични дози инсулин. Ето защо, количеството подкожен инсулин, необходимо за достигане на онази концентрация в порталната система,

която е достатъчна да потисне ендогенната глюкозна продукция от черния гроб, има за резултат повишени инсулинови нива в системната циркулация. Последните водят до повишено излагане на яйчника на действието на инсулина, потенциално благоприятстващо андрогенната синтеза там (13).

Хипергликемията сама по себе си е друг важен фактор, повлияващ репродуктивната функция при ЗДм1. Наблюдавана е понижена LH секреция в отговор на екзогенен GnRH, като прогължителността на ЗД и хипергликемията корелират с тези промени. Хипергликемията повишава апоптозата и нарушава секрецията на GnRH (14). Високата кръвна захар повлиява неблагоприятно яйчниковата функция чрез продуктите на напреднало гликиране (AGE) (15). Неензимно гликиране на протеини, хипергликемията и променената микроциркулация, повишените нива на васкуларен растежен фактор са сред обсъжданите предпоставки и за по-ранното изчерпване на овариалния резерв (16).

**Целта** на нашето проучване е да се оцени влиянието на гликемичния контрол върху показателите на ХХГ ос при жени със ЗДм1 в репродуктивна възраст и да се оцени връзката на хормоналните с някои анамнестични и биохимични показатели на база сравнение с клинично здрави жени.

### Материали и методи

Настоящото проучване е трансверзално, обсервационно, тип случай-контрола при 37 жени със ЗДм1 и 83 клинично здрави жени в репродуктивна възраст. 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: доказан ЗД тип 2, наличие на сърдечна, дихателна, бъбречна или чернодробна недостатъчност, наличие на остра декомпенсация на метаболитното заболяване към момента на провеждане на изследванията, лечение на хронична съпътстваща патология, което би могло да повлияе хормоналните показатели.

Анамнезата, касаеща ЗДм1, включва възраст на поставяне на диагнозата, давност на заболяването, вид на прилагани инсулини, обща дневна доза инсулин (ОДД), доза на килограм телесно тегло инсулин (доза/кг). При всички участнички

в проучването са извършени следните антропометрични измервания: тегло, ръст, талия, ханш, изчислени са отношения Т/Х, Т/Р, изчислен е индекс на телесна маса спрямо стандартната формула (17). Клинично-химичните показатели: кръвна захар на гладно (FBG), урея (Urea), креатинин (CREA), общ холестерол (TC), ХДЛ холестерол (HDL-C), триглицериди (TG), пикочна киселина (UR AC), са извършени на клинично-химичен анализатор AU 480, Beckman Coulter (USA) по оригинални програми с конвенционални аналитичните принципи на използваните методи. LDL-C е изчисляван по формулата на Friedewald:  $LDL-C = Total\ Cholesterol - HDL - (Triglycerides/2,2)$ , когато триглицеридите не надвишат 4,5 mmol/L. Гликиран хемоглобин (HbA1C): Принцип: имунотурбидиметричен метод на 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).

Изследвани са базални нива на лутеинизиращ хормон (LH), фоликулостимулиращ хормон (FSH), естрадиол (E2), общ тестостерон (T), полови – хормони свързващ глобулин (SHBG), дехидроепиандростерон-сулфат (DHEA-S), Андростендион (Androstendione, A4), Анти-Мюлеров хормон (AMH), 17- хидроксипрогестерон (17-OHPG), тиреостимулиращ хормон (TSH), серумен пролактин (Prl), агренокортикотропен хормон (ACTH), супрешен кортизол (corisol 8h). Изчислени са: LH/FSH, индекс на свободния тестостерон (FAI), използвана е следната формула за изчисление:  $Testosterone\ (nmol/l) \times 100 / SHBG\ (nmol/l)$ . Концентрациите на тестостерона са преизчислени от ng/ml в pmol/l чрез препоръчания от фирмата производител на тест-набора коефициент  $F = 3,47$ , т.е.  $1\ ng/ml \times 3,47 = 1\ pmol/l$ . Калкулирани по формулата на Vermeulen са свободен тестостерон (сFT) и бионаличен тестостерон (bioT) (18).

Всички клинично-лабораторни изследвания са извършени в Клинична Лаборатория на УМБАЛ „Св. Георги“ – ЕАД, Пловдив. Венозната кръв за лабораторните изследвания е взимана при стандартни условия – сутрин рано, след 12-часов период на нощно гладуване. Изследванията при жени са извършвани във фоликуларна фаза на менструалния цикъл (3-5-ти ден на спонтанен менструален цикъл) или до 7-ми ден след прогестерон индуцирано отпадно кръвене. За всички изследвани показатели се извършва системен вътрелaborаторен контрол на качеството и външна оценка на качеството на резултатите чрез участие национални и международни програми, за което лабораторията разполага със съответните сертификати. Кръвта за клинично-лабораторните изследвания е осигурена чрез

затворена система за вземане на биологичен материал (Sarstedt S-Monovette Serum Z/2,7 ml; Sarstedt S-Monovette K3 EDTA /2,6 ml). Серумни концентрации на LH, FSH, E2, T, SHBG, Prl, A4, DHEA-S, cortisol 8h, ACTH, TSH са изследвани чрез имуноензимен анализ с хемилуминисцентна детекция, анализатор: Access 2 Immunoassay System, Beckman Coulter, Inc., US, 17OHPG с имуноензимен (ELISA) анализ (ELISA Microplate Reader, SEAK, Italy). Нивата на Анти-Мюлеров хормон (серумна концентрация) са определени с парамагнитен имуноензимен анализ с хемилуминисцентна детекция (CLIA), анализатор: Access 2 Immunoassay System, Beckman Coulter, Inc., USA.

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  $\pm$  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 р-стойност  $< 0,05$  се отчита като статистически значима. По отношение на данните без параметрично разпределение, коефициентът на корелация на Спирмън ( $\rho$ ) е използван, когато липсва нормално разпределение, а корелационният коефициент на Пирсън ( $r$ ) е изчислен, при тези с нормално разпределение.

### Резултати

Средната възраст на изследваните жени е  $30,04 \pm 5,8$  г., като не се установява значима разлика между пациентките и контролите ( $31,8$  г. срещу  $30,9$  г.,  $U=1276$ ,  $p=0,140$ ). Налице е тенденция към по-високо телесно тегло, но също без разликите с контролната група да достигнат статистическа значимост ( $64,8; 14,7$  кг срещу  $61,95; 13,3$  кг,  $U=1544,50$ ,  $p=0,875$ ). Липсва сигнификантна разлика и по отношение на ИТМ при сравняваните групи жени ( $23,31; 4,93$  кг/м<sup>2</sup> срещу  $21,70; 4,99$  кг/м<sup>2</sup>,  $U=1321,50$ ,  $p=0,305$ ). Жените със ЗДм1 са с по-голяма обиколка на талията ( $74,27 \pm 7,93$  см,  $p=0,000$ ) и повишено отношение Т/Х ( $0,75 \pm 0,12$ ,  $p=0,000$ ) спрямо здравите контроли ( $66,18 \pm 5,12$  см,  $0,68 \pm 0,08$  см, респ.) при съпоставими данни за обиколката на ханша ( $p=0,789$ ). Освен това, не се установи разлика в показателя Т/Р при двете групи жени ( $p=0,120$ ) (Табл. 1). Очаквано, жените

със ЗДм1 имат сигнификантно по-високи нива на HbA<sub>1c</sub> ( $7,83 \pm 1,45\%$   $U=26$ ,  $p=0,000$ ) и кръвна захар на гладно (FBG) ( $7,49 \pm 2,51$  mmol/l,  $U=523,50$ ,  $p=0,000$ ) спрямо здравите контроли. Средната екскреция на албумин в 24ч. диуреза при жени със ЗДм1 е ( $9,7; 14,30$  mg/24) (Табл. 1).

Резултатите от проведените хормонални изследвания при жени със ЗДм1 и здрави контроли са представени на Таблица 2.

Установихме, че в групата ЗДм1 са сигнификантно по-високи спрямо контролната група нивата на LH ( $7,86; 4,92$  IU/L срещу  $5,08; 3,17$  IU/L;  $U=953,50$ ,  $p=0,001$ ) и съотношението LH/FSH ( $1,04; 1,04$  срещу  $0,74; 0,55$ ;  $U=953$ ,  $p=0,001$ ), както и T ( $0,60; 0,42$  ng/mL срещу  $0,45; 0,20$  ng/mL;  $U=706$ ,  $p=0,000$ ), FAI ( $3,52; 6,92$  срещу  $2,36 \pm 1,51$ ;  $U=940$ ,  $p=0,003$ ), cFT ( $0,006; 0,008$  ng/ml срещу  $0,005; 0,003$ ,  $U=897$ ,  $p=0,043$ ), BioT ( $0,16; 0,18$  ng/ml срещу  $0,12; 0,09$  ng/ml,  $U=837,50$ ,  $p=0,024$ ) и A4 ( $3,41 \pm 1,24$  срещу  $2,55 \pm 0,84$  ng/mL;  $U=480,50$ ,  $p=0,004$ ). Жените със ЗДм1 са със статистически значимо по-високи нива и на AMH ( $4,10; 3,66$  ng/ml,  $U=465,50$ ,  $p=0,040$ ) спрямо здравите контроли. Липсват значими разлики между двете групи жени по отношение нива на DHEA-S ( $U=1232$ ,  $p=0,336$ ), SHBG ( $U=1567,50$ ,  $p=0,456$ ), FSH ( $U=1839$ ,  $p=0,085$ ) и E2 ( $U=1385,50$ ,  $p=0,394$ ). Всички 120 жени са с данни за нормопролактинемия и нормална тиреоидна функция, при липса на статистически значими разлики в нивата на съответните хормони ( $U=1602$ ,  $p=0,548$ ,  $U=1249,50$ ,  $p=0,104$ , респ.). В референтни граници са стойностите на 17ОНPG, поради което беше изключена късна форма на вродена надбъбречно-корова хиперплазия (ВНКХ). Не се установяват сигнификантни разлики в нивата на 17ОНPG между двете групи жени ( $U=1366$ ,  $p=0,551$ ). Всички участнички са с нормални стойности и на сутрешен кортизол и ACTH, при липса на разлика в нивата им между таргетната и контролната група жени ( $U=1083$ ,  $p=0,072$ ,  $U=1032$ ,  $p=0,229$ , респ.).

Анализирахме връзката между антропометричните и хормоналните показатели при жени със ЗДм1. Положителна корелация е налице между ИТМ и A4 ( $\rho=0,392$ ,  $p=0,016$ ), както и между A4 и отношението Т/Х ( $\rho=0,395$ ,  $p=0,031$ ). Потърсихме връзка и между гликемичния контрол и хормоналните отклонения при жени със ЗДм1. Нивата на HbA<sub>1c</sub> са в права сигнификантна корелация с LH ( $\rho=0,437$ ,  $p=0,007$ ) и LH/FSH ( $\rho=0,391$ ,  $p=0,017$ ). FBG корелира положително с cFT ( $\rho=0,372$ ,  $p=0,023$ ) и A4 ( $\rho=0,393$ ,  $p=0,018$ ). Не се доказаха зависимости на микроалбуминурията с изследваните хормони.

Позовавайки се на критериите на Американската диабетна Асоциация (ADA) за таргет на гликемичен контрол (19), допълнително разделих

**Таблица 1.**

Антропометрични и биохимични показатели при жени със ЗДм1 и здрави контроли

Показател \ Група	ЗДм1 жени (n=37)	Контроли жени (n=83)	P - value
Възраст (г) <sup>^</sup>	31;8	30;9	0.140 <sup>^^</sup>
Тегло (кг) <sup>^</sup>	64.8;14.7	61.95;13.3	0.875 <sup>^^</sup>
ИТМ (кг/м <sup>2</sup> ) <sup>^</sup>	23.31;4.93	21.70;4.99	0.305 <sup>^^</sup>
Талия (см) <sup>*</sup>	74.27±7.93	66.18±5.12	<b>0.000<sup>**</sup></b>
Ханш (см) <sup>*</sup>	98.29±8.92	97.69±8.12	0.789 <sup>**</sup>
T/X <sup>*</sup>	0.75±0.12	0.68±0.08	<b>0.000<sup>**</sup></b>
T/P <sup>*</sup>	0.45±0.10	0.39±0.24	0.120 <sup>**</sup>
HbA <sub>1c</sub> (%) <sup>*</sup>	7.83±1.45	4.72±0.27	<b>0.000<sup>**</sup></b>
FBG (mmol/l) <sup>*</sup>	7.49±2.51	5.03±0.35	<b>0.000<sup>**</sup></b>
24 U-ALB (mg/24) <sup>^</sup>	9.7;14.30	-	-

\* - mean±SD ;

\*\* - T-test ;

<sup>^</sup> - Median; IQR;

<sup>^^</sup> - Mann-Whitney U test

Показател \ Групи	ЗДм1 (n=37)	Контроли жени (n=83)	P-value
	Median; IQR	Median; IQR	Mann-Whitney U test
LH (IU/L)	7.86;4.92	5.08;3.17	<b>0.001</b>
FSH (mIU/ml)	6.18;2.22	6.91;2.43	0.085
LH/FSH	1.04;1.04	0.74;0.55	<b>0.001</b>
E2 (pg/ml)	51.70;21.55	45.70;23.10	0.394
T (ng/ml)	0.60;0.42	0.45;0.20	<b>0.000</b>
SHBG (nmol/L) <sup>*</sup>	64.04±30.25	67.60±22.11	0.456 <sup>**</sup>
FAI	3.52;6.92	2.36;1.51	<b>0.003</b>
cFT (ng/ml)	0.006;0.008	0.005;0.003	<b>0.043</b>
BioT (ng/ml)	0.16;0.18	0.12;0.09	<b>0.024</b>
DHEA-S (µg/dl) <sup>*</sup>	226.18±104.48	201.62±72.74	0.336 <sup>**</sup>
A4 (ng/ml) <sup>*</sup>	3.41±1.24	2.55±0.84	0.004 <sup>**</sup>
Prl (mU/L)	210.57;126.0	232.65;145.49	0.548
TSH (mU/L)	2.21;1.79	1.77;1.19	0.104
ACTH (pg/ml)	20.26;9.47	18.56;9.45	0.229
Cortisol 8h (nmol/L) <sup>*</sup>	371.56±88.90	349.83±101.82	0.072 <sup>**</sup>
17OHPG (ng/ml)	1.0;1.6	1.2;2.0	0.551
AMH (ng/ml)	4.10;3.66	3.17;2,31	<b>0.040</b>

**Таблица 2.**

Хормонални показатели на жени със ЗДм1 и здрави контроли

\* - mean±SD,

\*\* - T-test

ме жените със ЗДм1 на две подгрупи според нивата - HbA<sub>1c</sub><7% и HbA<sub>1c</sub>≥7,0%. Така, 32,4% (n=12) жени се представят с добър гликемичен контрол. Останалите 67,6% (n=25) не са със zadovolителен контрол към момента на провеждане на изследванията. Данните от извършените антропометрични, анамнестични и биохимични изследвания са представени на Таблица 3.

Не се установяват статистически значими разлики между двете подгрупи жени със ЗД по отношение на възраст (30,0±6,33 г. срещу 31,20±5,80 г., U=161, p=1,000), тегло (64,62±12,18 кг срещу

63,50±10,01 кг, U=146, p=0,911) и ИТМ (23,20;6,57 кг/м<sup>2</sup> срещу 23,31;3,82 кг/м<sup>2</sup>, U=133, p=0,597). Жените с HbA<sub>1c</sub>≥7,0% очаквано са със статистически значимо по-високи нива на кръвна захар на гладно спрямо тези с HbA<sub>1c</sub><7,0% (U=231,50, p=0,007), по-висок гликиран хемоглобин и (U=300, p=0,000), при съпоставими нива на микроалбуминурия (U=140, p=0,761). И двете те подгрупи жени се представят със запазена бъбречна функция и съпоставими нива на урея (U=156, p=0,860), креатинин (U=160,50, p=0,737), пикочна киселина (U=171, p=0,511) и скорост на гломерулна филтрация (U=143,50, p=0,835).

(n) Показател	ЗДм1 жени HbA <sub>1c</sub> <7,0% (n=12)	ЗДм1 жени HbA <sub>1c</sub> ≥7,0% (n=25)	P - value
Възраст (z)*	30.0±6.33	31.20±5.80	1.000**
Тегло (кг)*	64.63±12.18	63.50±10.01	0.911**
ИТМ (кг/м <sup>2</sup> )^	23.20;6.57	23.31;5.59	0.597^^
Възраст на диагноза (z)*	16.42±7.68	17.72±8.19	0.786**
Давност ЗД (z)*	13.75±10.24	13.80±7.43	0.886**
ОДА (Е)*	49.83±21.57	56.40±14.81	0.227**
Доза/кг*	0.75±0.23	0.89±0.19	0.071**
ТС (mmol/l) ^	4.48;0.91	4.95;1.07	0.057^^
HDL-C (mmol/l) ^	1.37;0.39	1.31;0.57	0.835^^
LDL-C (mmol/l) ^	2.84;1.09	2.97;0.87	0.432^^
TG (mmol/l)^	0.58;0.45	1.06;1.51	0.013^^
Urea (mmol/l)^	4.55;1.5	4.40;1.7	0.860^^
Crea (μmol/l)*	60.58±4.46	62.48±9.72	0.737 **
UR AC (μmol/l)*	219.33±46.37	236.80±66.54	0.511**
eGFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )*	101.56±8.02	100.03±17.69	0.835 <sup>1</sup> **
FBG (mmol/l)*	5.92±1.38	8.24±2.60	0.007**
HbA <sub>1c</sub> (%)*	6.19±1.08	8.61±1.23	0.000**
U 24 ALB (mg/24)^	12.05;13.76	9.30;17.82	0.761^^

Таблица 3.

Анамнестични и биохимични показатели при жени със ЗДм1 спрямо нива на HbA<sub>1c</sub> </≥7,0%.

\* - mean±SD ;

\*\* - T-test ;

^ - Median; IQR ;

^^ - Mann-Whitney U test

По отношение на липидния профил – диабетичките с HbA<sub>1c</sub>≥7,0% са със статистически значимо по-високи нива на TG (p=0,015), при съпоставими за HDL-C (p=0,835) LDL-C (p=0,432) и с гранично ниво на значимост за TC (p=0,057), но недостигащо сигнификантна разлика.

Сравнителният анализ по отношение възрастта на диагностициране (U=158,50, p=0,786), давността на ЗД (U=154,50, p=0,886) и ОДА инсулин (U=187,50, p=0,227) е също без сигнификантни разлики в двете подгрупи жени със ЗДм1. Въпреки по-високата доза/кг телесно тегло инсулин в подгрупата с HbA<sub>1c</sub>≥7,0%, разликите не достигат сигнификантност (U=206, p=0,071). Хормоналните показатели на двете подгрупи жени са представени в Таблица 4. В подгрупата HbA<sub>1c</sub>≥7,0% се запазват завишените нива на LH (8,32;4,92, U=244, p=0,002) и отношението LH/FSH (1,10;1,05, U=217, p=0,030) спрямо подгрупата с HbA<sub>1c</sub><7,0%. Не се установяват статистически значими разлики по отношение на FSH (U=153,50, p=0,911), E2 (U=136, p=0,666), T (U=144,50, p=0,860) и SHBG (U=137, p=0,689). Съпоставими се отчитат изчислените FAI (U=161, p=0,737), cFT (U=143, p=0,835), BioT (U=147, p=0,934). Не се доказват и статистически значими разлики в нивата на андрогените: DHEA-S (U=147, p=0,936) и A4

(U=134,50, p=0,620). Жените от двете подгрупи не се различават по средни стойности на TSH (U=168, p=0,575), FT4 (U=159,50, p=0,761) и FT3 (U=145, p=0,483). Нивата на пролактин са в норма при липса на статистически значима разлика в показателя при двете подгрупи диабетички (U=111,50, p=0,215). Жените от двете подгрупи не се отличават и по нива на AMH (U=121,50, p=0,360), 17ОНPG (U=137, p=0,689), АСТН (U=186,50, p=0,156) и супрешен кортизол (U=181, p=0,142).

### Обсъждане

Жените със ЗДм1 в репродуктивно активна възраст показват по-високи нива на всички изследвани показатели на хиперандрогенизъм спрямо съответните по възраст здрави контроли, а гликираният хемоглобин е в сигнификантна права връзка с нивата на LH и отношението LH/FSH. След подразделяне на диабетичките на две подгрупи спрямо нива на гликиран хемоглобин </≥7,0%, се запазва връзката на показателя с по-високи нива LH и отношението LH/FSH само в подгрупата HbA<sub>1c</sub>≥7,0%.

Дали първоизточникът на част от репродуктивните нарушения при ЗДм1 е хипоталамусът или хипофизата е въпрос на широк научен дебат.

**Таблица 4.**

Хормонални показатели при жени със ЗДМ1 спрямо нива на HbA<sub>1c</sub> </≥7,0%.

Показател (n)	ЗДМ1, HbA <sub>1c</sub> <7,0% (n=12)	ЗДМ1, HbA <sub>1c</sub> ≥7,0% (n=25)	P-value
	Median; IQR	Median; IQR	Mann-Whitney U test
LH (IU/l)	4.91;3.57	8.32;4.92	<b>0.002</b>
FSH (mIU/ml)	5.87;2.19	6.24;2.51	0.911
LH/FSH	0.83;0.55	1.10;1.05	<b>0.030</b>
E2 (pg/ml)*	50.75±7.22	50.97±17.30	0.666**
T (ng/ml)	0.61;0.30	0.60;0.48	0.860
SHBG (nmol/l)*	67.04±32.95	62.61±29.47	0.689**
FAI	3.13;7.78	3.64;6.77	0.737
cFT (ng/ml)	0.007;0.012	0.006;0.008	0.835
BioT (ng/ml)	0.16;0.26	0.16;0.18	0.934
Prl (mU/l)	238.68;197.90	210.57;104	0.215
TSH (mU/l)*	2.20±1.13	2.44±1.21	0.575**
FT <sub>4</sub> (pmol/l)	10.89±1.48	11.05±1.63	0.761**
FT <sub>3</sub> (pmol/l)	4.13;0.53	4.09;0.56	0.483
DHEA-S (µg/dl)*	229.68±116.35	224.50±100.81	0.936**
A4 (ng/ml)*	2.88±1.54	3.02±0.62	0.620**
17OHPG (ng/ml)	0.95;1.9	1.1;1.6	0.689
AMH (ng/ml)	4.23;2.99	4.86;2.98	0.360
ACTH (pg/ml)*	19.62±6.29	23.96±9.30	0.156**
Cortisol 8h (nmol/l)*	336.28±104.31	387.07±78.55	0.142**

\*mean±SD;

\*\* - T-test;

Базалните концентрации на LH и FSH при жени със ЗДМ1 обичайно не се отличават от тези на здравите контроли (20,21). Djursing и сътр. (22,23) насочват вниманието към жените със ЗДМ1 и аменорея, които са с ниски изходни нива на LH и понижен отговор към екзогенно приложение на GnRH. Grossman и сътр. (24) съобщават за нормален LH отговор, а South и сътр. (25) за повишен такъв към екзогенен GnRH, подобен на този при жени с хиперпролактинемия или анорексия невроза. Различният отговор на LH към екзогенен GnRH насочва вниманието към хипоталамуса като първоизточник на репродуктивните нарушения при жени със ЗДМ1 (20,25). Промененият LH отговор при екзогенно приложение на GnRH може да се дължат на повишените нива на кръвна захар (26), инсулинопенията *per se* и продължителността на заболяването (27).

Редица автори демонстрират клинична и/или биохимична хиперандрогенемия при жени със ЗДМ1. Приема се, че андрогенният ексцес при жените със ЗДМ1 е основно от овариален произход, тъй като отговорите на адриналните андрогенни прекурсори към ACTH – стимулационните тестове са подобни на тези при здрави жени (28).

Стимулирана е LH медираната андрогенна синтеза в яйчника от инсулина. При сигнификантно завишени нива на A4 в нашето проучване, нивата на DHEA-S при двете групи жени са съпоставими. Съпоставимите нива на DHEA-S между диабетички и здрави контроли в нашето проучване се явява в подкрепа на посочените данни.

През 2006 г. Sodner и сътр. (29) установяват по-високи нива на общия серумен тестостерон, A4 и 17OHPG при жени със ЗДМ1 при съпоставими нива на SHBG, DHEA-S, FSH, LH, LH/FH E2. Възрастта на откриване на заболяването, гликемичният контрол, средната инсулинова доза и продължителността на заболяването не повлияват статистически значимо резултатите (29). В нашето проучване нивата на HbA<sub>1c</sub>, обаче, са в права корелация с LH и LH/FSH, а кръвната захар на гладно корелира положително с cFT и A4. Хипергликемията повлиява репродуктивната система по два основни механизма. Първият е свързан с инсулиновата резистентност, вторично на глюкозната токсичност, а вторият е чрез повишено образуване на крайни продукти на гликирането.

След подгледя на групата ЗДМ1 на две под-

групи спрямо нива на гликиран хемоглобин, не се запази по-голямата честота на биохимична хиперандрогенемия в подгрупата ЗДм1 с  $HbA_{1c} \geq 7,0\%$ .

При по-голяма честота на хиперандрогенизъм при жени със ЗДм1, единственият фактор за това се явява интензифицираното инсулинолечение (30). ИТМ, гликираният хемоглобин, началото на заболяването преди менархе не повлияват съществено както повишените нива на андрогените. Макар нивата на гликиран хемоглобин да са сравнително високи в цитираното проучване ( $8,6 \pm 0,3\%$ ), изглежда това няма отношение към овариалните андрогени (30).

Според друго проучване, хиперандрогенните и нормоандрогенните диабетички имат съпоставими нива на  $HbA_{1c}$  ( $7,4 \pm 1,2\%$  срещу  $7,8 \pm 1,2\%$ ), като не е установена разлика в средната дневна инсулинова доза ( $p=0,185$ ), както и корелация на хормонални и метаболитни показатели и при двете групи жени (31). Аналогично, в нашето проучване не се установи сигнификантна разлика в давността на заболяването и приложените инсулинови дози между двете подгрупи диабетички, както и корелация на хормонални с метаболитни показатели.

Налице са повишени нива на андрогени при жени със ЗДм1, но те не корелират с гликемичния контрол и приложените инсулинови дози и според друг колектив (32).

Двете подгрупи диабетички са със съпоставими нива на АМХ в нашето проучване. *Al Khafaji и сътр.* (33) доказват сигнификантно по-ниски нива на АМН при диабетички ( $p=0,000$ ) с по-висок гликиран хемоглобин ( $p=0,000$ ) спрямо здрави контроли, а ЗДм1 се явява независим рисков фактор за ниските нива на хормона при жени в репродуктивно активна възраст в тяхното проучване. С подобни резултати е и проучването на *Kadiroğulları и сътр.* (34) от 2019 г. Изследвани са 42 жени със ЗДм1 и 65 здрави контроли. Нивата на АМН и AFC са по-ниски при жени със ЗД тип 1 ( $p=0,001$ ), като влошеният гликемичен контрол оказва сигнификантно влияние върху нивата на АМН (34).

Жените със ЗДм1 имат съпоставими тегло, ИТМ и Т/Р, но са с по-голяма обиколка на талията и имат повишено отношение Т/Х в сравнение със съответни по възраст клинично здрави жени, което повишава риска от развитие на метаболитен синдром при тях. Различни индекси и отношения се използват за оценка на риска от развитие и прогресия на захарен диабет и свързания с него кардиометаболитен риск. 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 (35). Обиколката на талията корелира по-добре с абдоминалната мастна тъкани и

често служи за оценка на СС риск (35). Отношението Т/Х се използва за надеждна оценка на преразпределението на мастната тъкан в тялото и определяне затлъстяването, като служи и за неинвазивна оценка на СС риск (36). В световната литература се натрупват все повече данни за повишена честота на метаболитен синдром (МС) сред пациентите със ЗДм1 (37).

В настоящето проучване се установиха по-високи нива на триглицериди в подгрупата на жени със ЗДм1 с  $HbA_{1c} \geq 7,0\%$ , при съпоставими за останалите показатели на липидния профил с подгрупата жени с  $HbA_{1c} < 7,0\%$ . Хипертриглицеридемия, повишени нива на LDL-C и по-ниски HDL-C често се наблюдават при влошен метаболитен контрол при лица със ЗДм1, особено при  $HbA_{1c} > 7,5\%$  (38). Вторично на инсулиновия дефицит се обяснява хипертриглицеридемията като резултат на повишена продукция на VLDL от по-голямото количество циркулиращи количество свободни мастни киселини (39). Намален клирънс на постпрандиални Sf 100–400 липопротеини (хиломикрони + VLDL) са наблюдавани при радиоизотопно изследване, проведено сред пациенти със ЗДм1 и лош гликемичен контрол (40). Обсервираните повишени нива на LDL-C при лош гликемичен контрол се дължат на повишен трансфер от VLDL към IDL и от IDL към LDL в резултат на повишения VLDL (39).

При пациенти с оптимален гликемичен контрол нивата на триглицериди и LDL-C са нормални или леко намалени. Обсъжда се периферна хиперинсулинемия в резултат на подкожното приложение на инсулин, която резултира в повишен VLDL метаболизъм и повишена експресия на LDL-рецептори като възможно обяснение за наблюдаваните промени в мастния профил при лица със ЗДм1 с оптимален гликемичен контрол (41).

Съобщава се за повишаване с 0,101 ммол/л за TC, 0,052 ммол/л за TG, 0,103 ммол/л за LDL-C и 0,129 ммол/л за по-ниски HDL-C за всяко покачване на  $HbA_{1c}$  с 1% (42). *Gu и сътр.* (43) анализират 512 пациенти със сравнителна кратка давност на ЗДм1 – 4,2 години. Лицата с гликиран хемоглобин  $> 7,5\%$  се представят със сигнификантни отклонения в липидния профил, докато тези с добър гликемичен контрол имат съпоставими нива на TC, LDL-C и по-ниски HDL-C с контролите.

**В заключение,** жените със ЗДм1 с  $HbA_{1c} \geq 7,0\%$  имат сходни антропометрични и анамнестични (касаещи диабета) данни с тези при диабетичките с добър гликемичен контрол ( $HbA_{1c} < 7,05$ ). Въпреки липсата на по-висока честота на биохимична хиперандрогенемия нивата на LH и отношението LH/FSH са по-високи в подгрупата с  $HbA_{1c} \geq 7,0\%$  спрямо подгрупата с  $HbA_{1c} < 7,0\%$ , което е важно с оглед цялостния диагностичен и терапевтичен подход при тези пациентки.

# Does Glycemic Control Affect Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Women with Type 1 Diabetes Mellitus

Ilieva-Gerova, Maria I.<sup>1</sup>, Orbetzova, Maria M.<sup>1</sup>, Raycheva, Ralitsa D.<sup>2</sup>, Deneva, Tanya I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Clinic of Endocrinology and metabolic diseases „Sv. Georgy“, University Hospital, Department of Endocrinology, Faculty of medicine, MU, Plovdiv

<sup>2</sup> Department of Social Medicine and Public Health, Faculty of Public Health, MU, Plovdiv

<sup>3</sup> Central Clinical Laboratory, University Hospital „Sv. Georgy“, Faculty of Pharmacy, MU, Plovdiv

## Address for correspondence:

Dr. Maria Ilieva-Gerova,

Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases,  
„Sv. Georgy“ University Hospital, MU - Plovdiv  
15A „Vasil Aprilov“ Blvd, Plovdiv - 4000  
e-mail: mimilieva@yahoo.com

Submitted: 13. 07. 2023

Accepted: 19. 07. 2023

## Abstract

Reproductive function is of great importance for the individual and depends on the subtle mechanisms of regulation and interaction between the hypothalamus, the pituitary gland and the gonads, united in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HHG). Well known, initially in animals and later in humans, is the association between metabolic and reproductive processes. In patients with type 1 diabetes mellitus (DMt1), the etiopathogenesis of the disease, insulin treatment, monitoring and regular correction of the metabolic control, alone or in combination have an influence on the HHG axis and contribute to some of the observed disturbances in women of reproductive age.

**Aim of the study:** To evaluate the relationship between glycemic control and hormones of the HHG axis in women with DMt1 of reproductive age.

**Materials and methods:** The study included 37 women with T1DM and 83 clinically healthy women serving as a control group. A detailed medical history was obtained regarding duration of the disease, total daily insulin dose (DID) and insulin dose per kilogram of body weight (dose/kg). All participants were examined for anthropometric and some biochemical parameters – weight, waist circumference, waist to hip ratio (WHR), waist to height ratio (WHtR), fasting blood glucose (FBG), glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), microalbuminuria (U-ALB), urea (Urea), creatinine (CREA), uric acid (UR AC), total cholesterol (TC), HDL cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), as well as basal levels of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E2), testosterone (T), sex-hormone binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), androstenedione (A4), Anti-Mullerian hormone (AMH), prolactin (Prl), thyroid-stimulating hormone (TSH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), morning cortisol (cortisol 8h), 17 – hydroxyprogesterone (17-OHPG). BMI, waist to height ratio (WHtR), waist to hip ratio (WHR), LH/FSH, free androgen index (FAI), calculated free (cFT) and bioavailable testosterone (BioT) were calculated.

**Results:** Women with DMt1 had significantly higher levels of LH (U=953,50, p=0,001) and the LH/FSH ratio (U=953, p=0,001), as well as T (U=706, p= 0,000), FAI (U=940, p=0,003), cFT (U=897, p=0,043), BioT (U=837,50, p=0,024), A4 (U=480,50, p=0,004) and AMH (U=465,50, p=0,040) compared to healthy controls. When further dividing the DMt1 group into two subgroups according to glycated hemoglobin levels (HbA<sub>1c</sub> </>7,0%), elevated LH levels (8,32;4,92, U=244, p=0,002) and LH/FSH ratio (1,10;1,05, U =217, p=0,030) were preserved only in the subgroup with HbA<sub>1c</sub> ≥7,0% with comparable levels for the other examined hormones: FSH (U=153,50, p=0,911), E2 (U= 136, p=0,666), T (U=144,50, p=0,860), SHBG (U=137, p=0,689), DHEA-S (U=147, p=0,936), A4 (U=134,50, p=0,620), 17OHPG (U=137, p=0,689) , AMH (U=121,50, p=0,360), ACTH (U=186,50, p=0,156) and morning cortisol (U=181, p=0,142). Calculated FAI (U=161, p=0,737), cFT (U=143, p=0,835), BioT (U=147, p=0,934) were also

without significant difference between the two subgroups. Normoprolactinemia and euthyroid function were present in all participants.

**Conclusion:** Women with type 1 diabetes in reproductively active age have higher levels of all investigated parameters of hyperandrogenism compared to age-matched healthy controls, while those with impaired metabolic control –  $HbA_{1c} \geq 7,0\%$  maintain higher levels of LH and LH ratio /FSH compared to the subgroup with  $HbA_{1c} < 7,0\%$ , but there were no significant differences in the other indices of the HHG axis, as well as the additionally examined hormones.

**Key words:** diabetes mellitus type 1, glycated hemoglobin, metabolic control, HHG axis.

## Introduction

Prior to the invention of insulin patients with type 1 diabetes mellitus suffered from hypogonadism and infertility (1). Insulin therapy ensures improvement of the reproductive disturbances of the patients, however, some of them still present. The main reproductive disturbances observed in female patients with DMt1 are as follow (2):

1. Hypothalamic anovulation/amenorrhea;
2. Shortened reproductive period – later menarche and earlier menopause;
3. Menstrual cycle disturbances (oligomenorrhea, amenorrhea, polymenorrhea);
4. PCOS like phenotype – hyperandrogenism and anovulation in the course of insulin treatment;
5. Autoimmune irregularity – increased anti-ovarian antibodies. As far as the link between glycemic control and insulin treatment and those particular disturbances is concerned, the literature is controversial.

The invention of insulin and the subsequent treatment in DMt1 patients was revolutionary and has saved millions of lives worldwide. Insulin treatment continues to provide benefits for diabetic patients. In the 1940's the incidence of hypogonadotropic hypogonadism reached 90% (3), gradually decreasing in following years to 30% (4), dropping to 8.2% during the 1990s (5). The use of insulin analogues and insulin pumps results in improvement of glycemic control (6). This is especially important for children and young diabetic patients (7). Optimised glycemic control ensures prevention of long term diabetic complications – nephropathy, proliferative retinopathy and cardio-vascular diseases (8).

Is it the insulinopenia per se, which is leading in DMt1, or some more factors affects the HHG axis, is a subject of active scientific research. In rats, parenteral administration of streptozotocin (STZ), which induces severe insulinopenia and resembles poorly controlled DMt1, causes severe hypogonadotropic hypogonadism in both males and females, with low levels of gonadotropins and sex steroids, reduced LH pulsatility,

and impaired feedback (9). In female rats, a delayed or absent preovulatory LH peak and anovulation were observed, and the disturbances were partially reversible after short-term insulin treatment (10).

However, what is the relation between glycemic control and hormonal changes when talking about the hypothalamic-pituitary axis? Physiologically, when the pancreas secretes insulin into the portal system, the liver is the organ exposed to the highest insulin concentrations and eliminates a significant portion of the secreted insulin (11). In patients with DMt1, subcutaneous insulin administration escapes this first pass effect of the liver and exposes the peripheral tissues to increased insulin doses (12). The optimal glycemic control and the intensified insulin treatment ensures long term prevention of diabetic complications, but sometimes results in supraphysiological insulin doses. Therefore, the amount of subcutaneous insulin necessary to achieve that concentration in the portal system which is sufficient to suppress endogenous glucose production by the liver, results in increased insulin levels in the systemic circulation. The latter leads to increased exposure of the ovary to insulin action, potentially favoring androgen synthesis in the ovaries (13).

Hyperglycemia is another important factor, affecting reproduction in DMt1. Some authors describe decreased LH secretion in response to exogenous GnRH, with DM duration and hyperglycemia correlating with these changes. Hyperglycemia stimulates apoptosis and impairs GnRH secretion (14). High blood glucose levels adversely affect ovarian function through advanced glycation end products (AGEs) (15). Non-enzymatic glycation of proteins, hyperglycemia and altered microcirculation as well as increased levels of vascular growth factor (VGF) are among the contributors for the earlier depletion of the ovarian reserve (16).

**The aim** of our study was to evaluate the impact of glycemic control on the parameters of the HHG axis in women with DMt1 of reproductive age and to evaluate the relationship between the hormonal and some anamnestic and biochemical indices based on a comparison with clinically healthy women.

## Materials and methods

We performed a cross-sectional, observational, case-control study in 37 women with DMt1 and 83 clinically healthy women of reproductive age. The study was conducted at the Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases at the University General Hospital „Sveti Georgy“ - Plovdiv in the period January 2018 - December 2020. All participants had given their written consent in accordance with the Declaration of Helsinki, as the study was approved by the Scientific Ethics Board of the Research Council at the Medical University - Plovdiv.

*Inclusion criteria* for the study were lack of: type 2 diabetes, pregnant and lactating women, the presence of heart, respiratory, renal or hepatic failure, presence of acute decompensation of the metabolic disease at the time of the study and treatment of chronic concomitant pathology that could affect hormonal indices.

A detailed history was taken regarding DMt1: age of diagnosis, duration of the disease, total daily insulin dose (DID), insulin dose per kilogram of body weight (dose/kg). The following anthropometric measurements were also performed: weight (W), height (H), waist, hip, calculated waist to height ratio (WHtR), waist to hip ratio (WHR) and body mass index (BMI) according to the standard formula (17). Clinical-chemical parameters were also studied: fasting blood glucose (FBG), urea (Urea), creatinine (CREA), total cholesterol (TC), HDL cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), uric acid (UR AC). The clinical and chemical indices were performed on a clinical chemistry analyzer AU 480, Beckman Coulter (USA) according to original programs with conventional analytical principles of the used methods LDL-C was calculated according to the Friedewald formula:  $LDL-C = Total\ Cholesterol - HDL - (Triglycerides/2,2)$ , when triglycerides do not exceed 4,5 mmol/L. Glycated hemoglobin was tested by turbidimetric immunoinhibitory method on clinical chemistry analyzer AU 480, Beckman Coulter (USA). Microalbuminuria in 24-hour diuresis was determined by an immunoturbidimetric method on the automatic clinical chemistry analyzer AU 480, Beckman Coulter (USA).

Basal levels of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E2), total testosterone (T), sex-hormone binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), androstenedione (Androstendione, A4), Anti-Müllerian hormone (AMH), 17-hydroxyprogesterone (17-OHPG), thyroid-stimulating hormone (TSH), serum prolactin (Prl), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), morning cortisol (corisol 8h) were studied.

Calculations were also performed: LH/FSH, Free Testosterone Index (FAI), the following formula was used:  $Testosterone\ (nmol/l) \times 100 / SHBG\ (nmol/l)$ . Testosterone concentrations were recalculated from ng/ml to nmol/l using the test kit manufacturer's recommended coefficient  $F = 3,47$ , i.e.  $1\ ng/ml \times 3,47 = 1\ nmol/l$ . Free testosterone (cFT) and bioavailable testosterone (bioT) were calculated using the Vermeulen formula (18).

All clinical and laboratory testing was studied in the Central Clinical Laboratory of UMBAL „St. Georgi“ - EAD, Plovdiv. Venous blood for laboratory tests were collected under standard conditions - early in the morning, after a 12-hour overnight fasting period. Studies in women were performed in the follicular phase of the menstrual cycle (days 3-5 of a spontaneous menstrual cycle) or up to day 7 after progesterone-induced bleeding. Systematic intra-laboratory quality control and external assessment of the quality are carried out for all investigated parameters through the participation of national and international programs, with the necessary laboratory certificates present. Serum concentrations of LH, FSH, E2, T, SHBG, Prl, A4, DHEA-S, cortisol 8h, ACTH, TSH were studied by enzyme-linked immunosorbent assay with chemiluminescent detection, analyzer: Access 2 Immunoassay System, Beckman Coulter, Inc., US, 17OHPG by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ELISA Microplate Reader, SEAK, Italy). Anti-Müllerian hormone levels (serum concentration) were determined by chemiluminescent detection paramagnetic enzyme analysis (CLIA), analyzer system: Access 2 Immunoassay System, Beckman Coulter, Inc., USA

Descriptive and inferential statistics were performed. Continuous variables were first tested for normality of statistical distribution by the Shapiro-Wilk test. All normal distribution measurement data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Comparisons between two groups were analysed with Student's t-tests for independent samples. The non-normally distributed data were expressed as median and interquartile range. Comparisons between groups were carried out with use of the non-parametric Mann-Whitney test for two independent groups. Regarding the data without a parametric distribution, Spearman's rho correlation coefficient was used for non-normally distributed and Pearson correlation (r) was applied when they were normally distributed data. Statistical analysis of the data was performed using SPSS v.26 for Windows (IBM Corp. Released 2019. Armonk, NY: IBM Corp). For all tests p-value  $<0,05$  indicated the statistical significance.

## Results

The mean age of the examined women was  $30,04 \pm 5,8$  years, and no statistically significant difference was found between patients and controls ( $31;8$  years vs.  $30;9$  years,  $U=1276$ ,  $p=0,140$ ). There was no significant difference in terms of BMI in the compared groups of women either ( $23,31;4,93$  kg/m<sup>2</sup> vs.  $21,70;4,99$  kg/m<sup>2</sup>,  $U=1321,50$ ,  $p=0,305$ ). Women with DMt1 had a larger waist circumference ( $74,27 \pm 7,93$  cm,  $p=0,000$ ) and increased WHR ( $0,75 \pm 0,12$ ,  $p=0,000$ ) compared to healthy controls ( $66,18 \pm 5,12$  cm,  $0,68 \pm 0,08$  cm, resp.) with comparable hip circumference ( $p=0,789$ ). In addition, no difference was observed in the WHtR in the two studied groups ( $p=0,120$ ) (Table 1). As expected, women with DMt1 had significantly higher levels of HbA<sub>1c</sub> ( $7,83 \pm 1,45\%$   $U=26$ ,  $p=0,000$ ) and FBG ( $7,49 \pm 2,51$  mmol/l,  $U=523,50$ ,  $p=0,000$ ) compared to healthy controls. The mean excretion of albumin in 24h. diuresis in DMt1 group was ( $9,7$ ;  $14,30$  mg/24) (Table 1).

The results of the hormonal testing are presented in Table 2.

Women with DMt1 had significantly higher levels of LH ( $7,86;4,92$  IU/L vs.  $5,08;3,17$  IU/L;  $U=953,50$ ,  $p=0,001$ ) and LH/FSH ratio ( $1,04;1,04$  vs.  $0,74;0,55$ ;  $U=953$ ,  $p=0,001$ ), as well as T ( $0,60;0,42$  ng/mL vs.  $0,45;0,20$  ng/mL;  $U=706$ ,  $p=0,000$ ), FAI ( $3,52;6,92$  vs.  $2,36 \pm 1,51$ ;  $U=940$ ,  $p=0,003$ ), cFT ( $0,006;0,008$  ng/ml vs.  $0,005;0,003$ ,  $U=897$ ,  $p=0,043$ ), BioT ( $0,16;0,18$  ng/ml vs.  $0,12;0,09$  ng/ml,  $U=837,50$ ,  $p=0,024$ ), AMH ( $4,10;3,66$  ng/ml,  $U=465,50$ ,  $p=0,040$ ) and A4 ( $3,41 \pm 1,24$  vs.  $2,55 \pm 0,84$  ng/mL;  $U=480,50$ ,  $p=0,004$ ) compared to healthy controls. There were no significant differences between the two groups of women regarding levels of DHEA-S ( $U=1232$ ,  $p=0,336$ ), SHBG ( $U=1567,50$ ,  $p=0,456$ ), FSH ( $U=1839$ ,  $p=0,085$ ) and E2 ( $U=1385,50$ ,  $p=0,394$ ). All 120 women had normoprolactinemia and euthyroid function, with no statistically significant differences in the hormonal levels ( $U=1602$ ,  $p=0,548$ ,  $U=1249,50$ ,  $p=0,104$ , resp.). The values of 17OHPG are within reference range, therefore a late onset congenital adrenal hyperplasia was excluded. No significant differences were found in the levels of 17OHPG between the two groups ( $U=1366$ ,  $p=0,551$ ). All participants had normal values of morning cortisol and ACTH, with no difference in their levels between the diabetic and the control group ( $U=1083$ ,  $p=0,072$ ,  $U=1032$ ,  $p=0,229$ , resp.).

We analyzed the relationship between the anthropometric and hormonal indices in women with DMt1. A positive correlation was demonstrated between BMI and A4 ( $\rho=0,392$ ,  $p=0,016$ ), as well as between A4 and the WHR ( $\rho=0,395$ ,  $p=0,031$ ).

With respect to glycemic control, a significant

positive correlation of HbA<sub>1c</sub> with both LH ( $\rho=0,437$ ,  $p=0,007$ ) and LH/FSH ( $\rho=0,391$ ,  $p=0,017$ ) was observed. FBG correlated positively with cFT ( $\rho=0,372$ ,  $p=0,023$ ) and A4 ( $\rho=0,393$ ,  $p=0,018$ ).

Referring to the American Diabetes Association (ADA) for glycemic control targets, criteria (19), we further divided women with DMt1 into two subgroups concerning glycated hemoglobin levels - HbA<sub>1c</sub> <7% and HbA<sub>1c</sub> ≥7,0%. 32,4% ( $n=12$ ) women presented with good glycemic control. The remaining 67,6% ( $n=25$ ) were with poor metabolic control at the time of the research. The performed anthropometric, anamnestic and biochemical data are presented in Table 3.

No statistically significant differences were found between the two subgroups of women with DMt1 in terms of age ( $30,0 \pm 6,33$  years vs.  $31,20 \pm 5,80$  years,  $U=161$ ,  $p=1,000$ ), weight ( $64,62 \pm 12,18$  kg vs.  $63,50 \pm 10,01$  kg,  $U=146$ ,  $p=0,911$ ) and BMI ( $23,20;6,57$  kg/m<sup>2</sup> vs.  $23,31;3,82$  kg/m<sup>2</sup>,  $U=133$ ,  $p=0,597$ ). As expected, women with HbA<sub>1c</sub> ≥7,0% had statistically significantly higher fasting blood glucose levels ( $U=231,50$ ,  $p=0,007$ ), higher glycated hemoglobin ( $U=300$ ,  $p=0,000$ ), and comparable levels of microalbuminuria ( $U=140$ ,  $p=0,761$ ). Both subgroups of diabetic women presented with preserved renal function and comparable levels of urea ( $U=156$ ,  $p=0,860$ ), creatinine ( $U=160,50$ ,  $p=0,737$ ), uric acid ( $U=171$ ,  $p=0,511$ ) and glomerular filtration ( $U=143,50$ ,  $p=0,835$ ). Regarding the lipid profile - women with HbA<sub>1c</sub> ≥7,0% had statistically significantly higher levels of TG ( $p=0,015$ ), comparable for HDL-C ( $p=0,835$ ) LDL-C ( $p=432$ ) and with borderline level of significance for TC ( $p=0,057$ ).

The hormonal data of the two subgroups of women is presented in Table 4. In the HbA<sub>1c</sub> ≥7,0% subgroup, we observed elevated levels of LH ( $8,32;4,92$ ,  $U=244$ ,  $p=0,002$ ) and LH/FSH ratio ( $1,10;1,05$ ,  $U=217$ ,  $p=0,030$ ) compared to the subgroup with HbA<sub>1c</sub> <7,0%. No statistically significant differences were found regarding the rest of the hormones: FSH ( $U=153,50$ ,  $p=0,911$ ), E2 ( $U=136$ ,  $p=0,666$ ), T ( $U=144,50$ ,  $p=0,860$ ) and SHBG levels ( $U=137$ ,  $p=0,689$ ). The calculated FAI ( $U=161$ ,  $p=0,737$ ), cFT ( $U=143$ ,  $p=0,835$ ) and BioT ( $U=147$ ,  $p=0,934$ ) are comparable as well. No significant differences were found in the levels of androgens either: DHEA-S ( $U=147$ ,  $p=0,936$ ) and A4 ( $U=134,50$ ,  $p=0,620$ ). Women from the two subgroups did not differ in terms of TSH ( $U=168$ ,  $p=0,575$ ), FT<sub>4</sub> ( $U=159,50$ ,  $p=0,761$ ), FT<sub>3</sub> ( $U=145$ ,  $p=0,483$ ) and Prl levels ( $U=111,50$ ,  $p=0,215$ ). We also demonstrated comparable levels of AMH ( $U=121,50$ ,  $p=0,360$ ), 17OHPG ( $U=137$ ,  $p=0,689$ ), ACTH ( $U=186,50$ ,  $p=0,156$ ) and morning cortisol ( $U=181$ ,  $p=0,142$ ) between the two subgroups of diabetic women.

**Table 1.**

Anthropometric and biochemical parameters in women with DMt1 and healthy controls.

Parameter \ Group	DMt1 (n=37)	Controls (n=83)	P - value
Age (y) <sup>^</sup>	31;8	30;9	0.140 <sup>^^</sup>
Weight (kg) <sup>^</sup>	64.8;14.7	61.95;13.3	0.875 <sup>^^</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>^</sup>	23.31;4.93	21.70;4.99	0.305 <sup>^^</sup>
Waist (cm) <sup>*</sup>	74.27±7.93	66.18±5.12	<b>0.000<sup>**</sup></b>
Hip (cm) <sup>*</sup>	98.29±8.92	97.69±8.12	0.789 <sup>**</sup>
WHR <sup>*</sup>	0.75±0.12	0.68±0.08	<b>0.000<sup>**</sup></b>
WHtR <sup>*</sup>	0.45±0.10	0.39±0.24	0.120 <sup>**</sup>
HbA <sub>1c</sub> (%) <sup>*</sup>	7.83±1.45	4.72±0.27	<b>0.000<sup>**</sup></b>
FBG (mmol/l) <sup>*</sup>	7.49±2.51	5.03±0.35	<b>0.000<sup>**</sup></b>
24 U-ALB (mg/24) <sup>^</sup>	9.7;14.30	-	-

\* - mean±SD ;

\*\* - T-test ;

<sup>^</sup> - Median; IQR;

<sup>^^</sup> - Mann-Whitney U test

Parameter \ Group	DMt1 (n=37)	Controls (n=83)	P-value
	<i>Median; IQR</i>	<i>Median; IQR</i>	<i>Mann-Whitney U test</i>
LH (IU/L)	7.86;4.92	5.08;3.17	<b>0.001</b>
FSH (mIU/ml)	6.18;2.22	6.91;2.43	0.085
LH/FSH	1.04;1.04	0.74;0.55	<b>0.001</b>
E2 (pg/ml)	51.70;21.55	45.70;23.10	0.394
T (ng/ml)	0.60;0.42	0.45;0.20	<b>0.000</b>
SHBG (nmol/L) <sup>*</sup>	64.04±30.25	67.60±22.11	0.456 <sup>**</sup>
FAI	3.52;6.92	2.36;1.51	<b>0.003</b>
cFT (ng/ml)	0.006;0.008	0.005;0.003	<b>0.043</b>
BioT (ng/ml)	0.16;0.18	0.12;0.09	<b>0.024</b>
DHEA-S (µg/dl) <sup>*</sup>	226.18±104.48	201.62±72.74	0.336 <sup>**</sup>
A4 (ng/ml) <sup>*</sup>	3.41±1.24	2.55±0.84	0.004 <sup>**</sup>
Prl (mU/L)	210.57;126.0	232.65;145.49	0.548
TSH (mU/L)	2.21;1.79	1.77;1.19	0.104
ACTH (pg/ml)	20.26;9.47	18.56;9.45	0.229
Cortisol 8h (nmol/L) <sup>*</sup>	371.56±88.90	349.83±101.82	0.072 <sup>**</sup>
17OHPG (ng/ml)	1.0;1.6	1.2;2.0	0.551
AMH (ng/ml)	4.10;3.66	3.17;2,31	<b>0.040</b>

**Table 2.**

Hormonal parameters in women with DMt1 and healthy controls.

\* - mean±SD,

\*\* - T-test

## Discussion

Women with DMt1 of reproductive age have higher levels of all investigated indices of hyperandrogenism compared to age-matched healthy controls, and glycated hemoglobin was in a significant direct relationship with both LH levels and LH/FSH ratio. After subdividing the diabetics into two subgroups based on glycated hemoglobin levels <math>\leq 7,0\%</math>, the relationship of the indicator with elevated LH levels and the LH/FSH

ratio remained only in the HbA<sub>1c</sub> ≥7,0% subgroup.

There is a contraversion – is the hypothalamus or the pituitary gland the primary source of the reproductive disorders in DMt? Basal concentrations of LH and FSH in women with DMt1 are comparable with those of the healthy individuals in most cases (20, 21). Djursing et al. (22, 23) payed attention to women with DMt1 and amenorrhea with low baseline LH levels and a decreased response to exogenous GnRH administration. Grossman et al. (24) reported a normal LH response,

Group Parameter	DMt1 HbA <sub>1c</sub> <7,0% (n=12)	DMt1 HbA <sub>1c</sub> ≥7,0% (n=25)	P - value
Age (y)*	30.0±6.33	31.20±5.80	1.000**
Weight (kg)*	64.63±12.18	63.50±10.01	0.911**
BMI (kg/m <sup>2</sup> )^	23.20;6.57	23.31;5.59	0.597^^
Age at diagnosis (y)*	16.42±7.68	17.72±8.19	0.786**
DMt1 duration (y)*	13.75±10.24	13.80±7.43	0.886**
DID (E)*	49.83±21.57	56.40±14.81	0.227**
dose/kg*	0.75±0.23	0.89±0.19	0.071**
TC (mmol/l) ^	4.48;0.91	4.95;1.07	0.057^^
HDL-C (mmol/l) ^	1.37;0.39	1.31;0.57	0.835^^
LDL-C (mmol/l) ^	2.84;1.09	2.97;0.87	0.432^^
TG (mmol/l)^	0.58;0.45	1.06;1.51	0.013^^
Urea (mmol/l)^	4.55;1.5	4.40;1.7	0.860^^
Crea (μmol/l)*	60.58±4.46	62.48±9.72	0.737 **
UR AC (μmol/l)*	219.33±46.37	236.80±66.54	0.511**
eGFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )*	101.56±8.02	100.03±17.69	0.835 <sup>1</sup> **
FBG (mmol/l)*	5.92±1.38	8.24±2.60	0.007**
HbA <sub>1c</sub> (%)*	6.19±1.08	8.61±1.23	0.000**
U 24 ALB (mg/24)^	12.05;13.76	9.30;17.82	0.761^^

**Table 3.**

Anamnestic, anthropometric and biochemical parameters in women with DMt1 divided by HbA<sub>1c</sub> </≥7,0%.

\* - mean±SD ;  
 \*\* - T-test ;  
 ^ - Median; IQR ;  
 ^^ - Mann-Whitney U test

while South et al. (25) an increased one to exogenous GnRH, similar to the one in women with hyperprolactinemia or anorexia nervosa. The difference in LH response to exogenous GnRH points to the hypothalamus as the primary source of reproductive abnormalities in women with DMt1 (20, 25). On the other hand, altered LH response to exogenous GnRH administration may be due to elevated blood glucose levels (26), insulinopenia per se, and disease duration (27).

A number of authors have demonstrated clinical and/or biochemical hyperandrogenemia in women with DMt1. Androgen excess is assumed to be primarily of ovarian origin since the responses of adrenal androgen precursors to ACTH stimulation tests are pretty similar to those in healthy individuals (28). LH-mediated androgen synthesis in the ovary is stimulated directly by insulin. With significantly elevated A4 levels in our study, DHEA-S levels in the two groups of women remained comparable, which appears to support these data.

In 2006, Codner et al. (29) found higher levels of total serum testosterone, A4, and 17OHPG in women with DMt1 with comparable levels of SHBG, DHEA-S, FSH, LH, LH/FH E2. Age at diagnosis, glycemic control, mean insulin dose, and disease duration did not statistically significantly affect the results (29). In our study, however, HbA1C levels were positively correlated with LH and LH/FSH, and FBG was positively correlated

with cFT and A4. Hyperglycemia affects the reproductive system by two main mechanisms. The first one is related to insulin resistance secondary to glucose toxicity, and the second one is through increased formation of glycation end products (29).

After further dividing the DMt1 group into two subgroups according to glycosylated hemoglobin levels, the greater frequency of biochemical hyperandrogenemia in the DMt1 subgroup with HbA<sub>1c</sub> ≥7,0% was not preserved.

Women with DM1 have a higher frequency of hyperandrogenism and the only related factor appears to be the intensified insulin treatment (30). Levels of BMI, glycosylated hemoglobin, onset of the disease before menarche did not significantly correlate with the elevated androgen levels. Although glycosylated hemoglobin levels were relatively elevated in this study (8,6±0,3%), this was not related to the ovarian androgens (30).

Another study demonstrated that hyperandrogenic and normoandrogenic diabetic females had comparable levels of HbA<sub>1c</sub> (7,4±1,2% vs. 7,8±1,2%), with no difference observed in the average daily insulin dose (p=0,185), as well as no statistically significant correlation between hormonal and metabolic parameters in both groups of women (31). Similarly, in our study, no significant differences were found in the duration of the disease and administered insulin doses between the

**Table 4.**

Hormonal parameters in DMt1 group divided by HbA<sub>1c</sub> </≥7,0%.

Parameter	Group	3Δm1, HbA <sub>1c</sub> <7,0% (n=12)	3Δm1, HbA <sub>1c</sub> ≥7,0% (n=25)	P-value
		Median; IQR	Median; IQR	Mann-Whitney U test
LH (IU/l)		4.91;3.57	8.32;4.92	<b>0.002</b>
FSH (mIU/ml)		5.87;2.19	6.24;2.51	0.911
LH/FSH		0.83;0.55	1.10;1.05	<b>0.030</b>
E2 (pg/ml)*		50.75±7.22	50.97±17.30	0.666**
T (ng/ml)		0.61;0.30	0.60;0.48	0.860
SHBG (nmol/l)*		67.04±32.95	62.61±29.47	0.689**
FAI		3.13;7.78	3.64;6.77	0.737
cFT (ng/ml)		0.007;0.012	0.006;0.008	0.835
BioT (ng/ml)		0.16;0.26	0.16;0.18	0.934
Prl (mU/l)		238.68;197.90	210.57;104	0.215
TSH (mU/l)*		2.20±1.13	2.44±1.21	0.575**
FT <sub>4</sub> (pmol/l)		10.89±1.48	11.05±1.63	0.761**
FT <sub>3</sub> (pmol/l)		4.13;0.53	4.09;0.56	0.483
DHEA-S (μg/dl)*		229.68±116.35	224.50±100.81	0.936**
A4 (ng/ml)*		2.88±1.54	3.02±0.62	0.620**
17OHPG (ng/ml)		0.95;1.9	1.1;1.6	0.689
AMH (ng/ml)		4.23;2.99	4.86;2.98	0.360
ACTH (pg/ml)*		19.62±6.29	23.96±9.30	0.156**
Cortisol 8h (nmol/l)*		336.28±104.31	387.07±78.55	0.142**

\*mean±SD;

\*\* - T-test;

two subgroups of DMt1 women, as well as there is no correlation between hormonal and metabolic parameters. Androgens in women with DMt1 are increased, but they do not correlate with glycemic control and administered insulin doses according to another group of researchers (32).

The two diabetic subgroups had comparable AMH levels in our study. Al Khafaji et al. (33) demonstrated significantly lower levels of AMH in diabetic women (p=0,000) with higher glycated hemoglobin (p=0,000), and DMt1 was an independent risk factor for the results. The study by Kadiroğulları et al (34) had similar results. 42 women with DM1 and 65 healthy controls were studied. AMH and AFC levels were lower in women with type 1 diabetes (p=0,001), with impaired glycemic control having a significant impact on AMH levels (34).

Women with DMt1 have comparable weight, BMI, and WHtR, but have a larger waist circumference and an increased WHR compared to age-matched clinically healthy women. This increases their risk of developing metabolic syndrome. Various indices are used to assess the risk of development and progression of diabetes mellitus and the associated cardometabolic risk. BMI is one of the most

commonly used in every day clinical practice for screening, but it is not a useful indicator to distinguish between muscle and adipose tissue (35). Waist circumference correlates better with abdominal adipose tissue and is often used to assess CV risk (36). The WHR is used to assess the redistribution of adipose tissue in the body and define obesity, serving as a non-invasive assessment of CV risk (36). There is increasing evidence in the literature that the incidence of metabolic syndrome (MS) among patients with DMt1 is rising (37).

In the present study, we demonstrated higher TG levels in the subgroup of women with T1DM with HbA<sub>1c</sub>≥7,0%. Hypertriglyceridemia, elevated levels of LDL-C and non-HDL-C are often observed in patients with poor metabolic control, especially when HbA<sub>1c</sub>>7,5% is present (38). Secondary to insulin deficiency, hypertriglyceridemia is explained as a result of increased production of VLDL because of the increased circulating free fatty acids (39). Reduced clearance of postprandial Sf 100-400 lipoproteins (chylomicrons + VLDL) was observed in a radioisotope study conducted among patients with DMt1 and poor glycemic control (40). The observed increased in LDL-C levels in poor glycemic control

are due to increased transfer from VLDL to IDL and from IDL to LDL as a result of increased VLDL (39).

In patients with optimal glycemic control, triglyceride and LDL-C levels are normal or slightly reduced. Peripheral hyperinsulinemia as a result of subcutaneous insulin administration, which results in increased VLDL metabolism and increased expression of LDL-receptors, has been discussed as a possible mechanism for the observed changes in the lipid profile in DMt1 patients with optimal glycemic control (41).

An increase of 0,101 mmol/L for TC, 0,052 mmol/L for TG, 0,103 mmol/L for LDL-C, and 0,129 mmol/L for non-HDL-C has been reported for each 1% increase in HbA<sub>1c</sub> (42). Guy et al. (43) analyzed 512 patients with a relatively short history of DMt1

– 4,2 years. Individuals with glycated hemoglobin >7,5% presented with significant disturbances in the lipid profile, while those with optimal glycemic control had comparable TC, LDL-C, and non-HDL-C levels to controls.

**In conclusion**, DMt1 women with HbA<sub>1c</sub> ≥7,0% have similar anthropometric and anamnestic (concerning DM data) to those diabetic women with good glycemic control (HbA<sub>1c</sub> <7,0%). Despite the absence of a higher frequency of biochemical hyperandrogenism, LH levels and the LH/FSH ratio were higher in the subgroup with HbA<sub>1c</sub> ≥7,0% compared to the subgroup with HbA<sub>1c</sub> <7,0%, which is an important result in view of the overall diagnostic and therapeutic approach towards these patients.

## References

1. Arrais RF, Dib SA. The hypothalamus-pituitary-ovary axis and type 1 diabetes mellitus: a mini review. *Hum Reprod* 2006; 21(2): 327-337.
2. Codner E, Cassorla F. Puberty and ovarian function in girls with type 1 diabetes mellitus. *Horm Res* 2009; 71(1): 12-21.
3. Gilbert JA, Dunlop DM. Diabetic fertility, maternal mortality, and foetal loss rate. *Br Med J* 1949; 1(4592): 48-51.
4. Bergqvist N. The gonadal function in female diabetics. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1954; 19: 1-20.
5. Kjaer K, Hagen C, Sando SH, Eshoj O. Epidemiology of menarche and menstrual disturbances in an unselected group of women with insulin-dependent diabetes mellitus compared to controls. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(2): 524-529.
6. Jacobsen IB, Henriksen JE, Nielsen OH, Vach W, Beck-Nielsen HB. Evidencebased insulin treatment in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 86(1): 1-10.
7. Gerstl EM, Rabl W, Rosenbauer J, Grobe H, Hofer SE, Krause U, et al. Metabolic control as reflect by HbA<sub>1c</sub> in children, adolescents and young adults with type-1 diabetes mellitus: combined longitudinal analysis including 27,035 patients from 207 centers in Germany and Austria during the last decade. *Eur J Pediatr* 2008; 167(4): 447-453.
8. Palta M, LeCaire T. Managing type 1 diabetes: trends and outcomes over 20 years in the Wisconsin Diabetes Registry Cohort. *Wisconsin Med J* 2009; 108(5): 231-234.
9. Kienast SG, Fadden C, Steger RW. Streptozotocin-induced diabetes blocks the positive feedback release of luteinizing hormone in the female rat. *Brain Research Bulletin* 1993; 32(4): 399-405.
10. Katayama S, Brownschidle CM, Wootten V, Lee JB, Shimaoka K. Absent or delayed preovulatory luteinizing hormone surge in experimental diabetes mellitus. *Diabetes* 1984; 33(4): 324-327.
11. Yki-Jarvinen H, Koivisto VA. Natural course of insulin resistance in type I diabetes. *N Engl J Med* 1986; 315(4): 224-230.
12. Escobar-Morreale HF, Roldan B, Barrio R, Alonso M, Sancho J, de la Calle H, et al. High prevalence of the polycystic ovary syndrome and hirsutism in women with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(11): 4182-4187.
13. Adcock CJ, Perry LA, Lindsell DR, Taylor AM, Holly JM, Jones J, et al. Menstrual irregularities are more common in adolescents with type 1 diabetes: association with poor glycaemic control and weight gain. *Diabet Med* 1994; 11 (5): 465-470.
14. Azar ST, Zalloua PA, Zantout MS, Shahine CH, Salti I. Leptin levels in patients with type 1 diabetes receiving intensive insulin therapy compared with those in patients receiving conventional insulin therapy. *J Endocrinol Invest* 2002; 25(8): 724-726.
15. Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Patsouris

- E, Korkolopoulou P, Panidis D, Pawelczyk L, et al. Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochem Cell Biol* 2007; 127(6): 581-589.
16. Kim C, Karvonen-Gutierrez C, Kong S, Arends V, Steffes M, McConnell DS, et al. Antimüllerian hormone among women with and without type 1 diabetes: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study and the Michigan Bone Health and Metabolism Study. *Fertil Steril* 2016; 106(6): 1446-1452.
17. 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(7): 412-419.
18. 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.
19. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2022 Abridged for Primary Care Providers. *Clin Diabetes* 2022; 40(1): 10-38.
20. Griffin ML, South SA, Yankov VI, Booth RA Jr, Asplin CM, Veldhuis JD, et al. Insulin-dependent diabetes mellitus and menstrual dysfunction. *Ann Med* 1994; 26(5): 331-340.
21. Schroeder B, Hertweck SP, Sanfilippo JS, Foster MB. Correlation between glycemic control and menstruation in diabetic adolescents. *J Reprod Med* 2000; 45(1): 1-5.
22. Djursing H, Hagen C, Nyholm HC, Carstensen L, Andersen AN. Gonadotropin responses to gonadotropin-releasing hormone and prolactin responses to thyrotropin-releasing hormone and metoclopramide in women with amenorrhea and insulin-treated diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 56(5): 1016-1021.
23. Djursing H, Nyholm HC, Hagen C, Molsted-Pedersen L. Depressed prolactin levels in diabetic women with anovulation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1982; 61(5): 403-406.
24. Grossman A, Moulton PJ, McIntyre H, Evans J, Silverstone T, Rees LH, et al. Opiate mediation of amenorrhoea in hyperprolactinaemia and in weight-loss related amenorrhoea. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1982; 17(4): 379-388.
25. South SA, Asplin CM, Carlsen EC, Booth RA Jr, Weltman JY, Johnson ML, et al. Alterations in luteinizing hormone secretory activity in women with insulin-dependent diabetes mellitus and secondary amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76(4): 1048-1053.
26. Distiller LA, Sagel J, Morley JE, Seftel HC. Pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1975; 24(4): 378-380.
27. Volpi R, Chiodera P, Gramellini D, Capretti L, Caffarri G, Speroni G, et al. Influence of residual insulin secretion and duration of diabetes mellitus on the control of luteinizing hormone secretion in women. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(10): 819-825.
28. Viridis R, Zampolli M, Street ME, Vanelli M, Potau N, Terzi C, Ghizzoni L, et al. Ovarian 17 alpha-hydroxyprogesterone responses to GnRH analog testing in oligomenorrheic insulin-dependent diabetic adolescents. *Eur J Endocrinol* 1997; 136(6): 624-629.
29. Codner E, Soto N, Lopez P, Trejo L, Avila A, Eyzaguirre FC, Iniguez G, Cassorla F. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome and ovarian morphology in women with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(6): 2250-2256.
30. Codner E, Soto N, Merino PM. Contraception, and pregnancy in adolescents with type 1 diabetes: a review. *Pediatr Diabetes* 2012; 13(1): 108-123.
31. Roldán B, Escobar-Morreale HF, Barrio R, de La Calle H, Alonso M, García-Robles R, et al. Identification of the source of androgen excess in hyperandrogenic type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2001; 24(7): 1297-1299.
32. Bizzarri C, Benevento D, Ravà L, Patera IP, Schiaffini R, Ciampalini P, Giannone G, Cappa M. Ovarian hyperandrogenism in adolescents and young women with type I diabetes is primarily related to birth weight and body mass index. *Fertil Steril* 2011; 96(6): 1497-1502.
33. Al Khafaji MM, Al-Tae HA, Al-Shaikh SF. Assessment of anti-Müllerian hormone level in reproductive age group women with diabetes mellitus type one. *Middle East Fertil Soc J* 2017; 22(4): 269-272.
34. Kadiroğulları P, Demir E, Bahat PY, Kiyak H, Seckin KD. Evaluation of relationship between HbA1c levels and ovarian reserve in patients with type 1 diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol*. 2020; 36(5): 426-430.
35. Hall DM, Cole TJ. What use is the BMI? *Arch Dis Child*. 2006; 91(4): 283-286.
36. Ness-Abramof R, Apovian CM: Waist circumference measurement in clinical practice. *Nutr Clin Pract* 2008, 23(4): 397-404.
37. 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.
38. Vergès B. Lipid disorders in type 1 diabetes. *Diabetes Metab*. 2009; 35(5): 353-360.
39. Vergès B. Dyslipidemia in Type 1 Diabetes: AMaskedDanger. *Trends Endocrinol Metab*. 2020; 31(6): 422-434.
40. Georgopoulos A, Phair RD. Abnormal clearance of postprandial Sf 100-400 plasma lipoproteins in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Lipid Res* 1991; 32(7): 1133-1141.
41. Duvillard L, Florentin E, Baillot-Rudoni S, Lalanne-Mistrich ML, Brun-Pacaud A, Petit JM, et al. Comparison of apolipoprotein B100 metabolism between continuous subcutaneous and intraperitoneal insulin therapy in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(10): 5761-5764.
42. Maahs DM, Ogden LG, Dabelea D, Snell-Bergeon JK, Daniels SR, Hamman RF, Rewers M. Association of glycaemia with lipids in adults with type 1 diabetes: modification by dyslipidaemia medication. *Diabetologia* 2010; 53(12): 2518-2525.
43. Guy J, Ogden L, Wadwa RP, Hamman RF, Mayer-Davis EJ, Liese AD, et al. Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. *Diabetes Care*. 2009; 32(3): 416-442.

# Ниски нива на серумен тестостерон при пациенти с остър коронарен синдром и асоциацията им със сърдечно-съдови рискови фактори

Шишков, Сави Р.<sup>1</sup>, Христозов, Кирил Х.<sup>1</sup>, Ангелов, Атанас А.<sup>2</sup>, Славчева, Светослава Е.<sup>2</sup>, Бочева, Яна Д.<sup>3</sup>, Бояджиева, Мила Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Втора катедра по вътрешни болести,

<sup>2</sup> Първа катедра по вътрешни болести,

<sup>3</sup> Катедра по Клинична лаборатория, Медицински университет, Варна

## Адрес за кореспонденция:

Шишков, Сави Р.,

Адрес за кореспонденция:  
УМБАЛ „Св. Марина“ Варна,  
бул. „Христо Смирненски“ 1,  
Варна, 9002,  
email: savirshishkov@gmail.com

Постъпване: 19. 07. 2023

Ревизия: 23. 07. 2023

Приемане: 25. 07. 2023

## Резюме

**Въведение:** Спадът в нивата на тестостерона (Т) у мъжа е феномен, зачестяващ с напредване на възрастта и обичайна находка по време на остри заболявания. Тъй като с напредване на възрастта се увеличава и честотата на сърдечно-съдовите заболявания (ССЗ), асоциацията на половите стероиди със сърдечно-съдовия риск е от практически интерес.

**Цел:** Целта е изследване на честотата на хипотестостеронемията и асоциацията на общия, свободния и бионаличния Т с някои сърдечно-съдови рискови фактори, както и с резултата от рисковия калкулатор GRACE при пациенти с остър коронарен синдром (ОКС).

**Материали и методи:** В острия период след настъпване на ОКС при пациентите бе изследван общ тестостерон, SHBG и изчислен свободен и бионаличен тестостерон. Данни за сърдечно-съдовия риск профил бяха взети от медицинската документация.

**Резултати:** В хода изследването бяха включени 72-ма пациенти с ОКС на средна възраст 56,12 г. и 35 здрави контроли на средна възраст 54,22 г. Пациентите с ОКС имат значимо по-ниски нива на всички фракции на тестостерона спрямо контроли (за общ, свободен и бионаличен Т,  $p < 0,05$ ). Поднормени стойности на общ Т се установяват в 52,78% от пациентите с ОКС (спрямо 29,4% при контроли,  $p < 0,05$ ), а за свободен Т в 65,28% (спрямо 45,78% при контроли,  $p < 0,05$ ) Установяват се негативни корелации между свободния Т и тропонина ( $r = -0,266$   $p = 0,024$ ), както и между свободния Т и GRACE, която се запазва и след коригиране спрямо възрастта. ( $r = -0,245$ ,  $p = 0,043$ ).

**Заключение:** С оглед на описаните резултати идентифицираме свободния Т като хормоналния маркер, най-тясно свързани със сърдечно-съдовия риск, изразен чрез GRACE. Освен това се установява значима асоциация между големината на миокардната некроза (тропонина) и свободния и бионаличния тестостерон.

**Ключови думи:** тестостерон, свободен тестостерон, андрогени, сърдечно-съдов риск, остър коронарен синдром.

## Въведение

В хода на стареенето у мъжа се наблюдава спад в нивата на тестостерона (Т) без анатомични нарушения в хипоталамо-хипофизарната ос (1). Такъв функционален хипогонадизъм на фона на ниски нива на Т и симптоми на андрогенната недостатъчност може да бъде категоризиран като хипогонадизъм с късно начало (ХКН) (2, 3). ХКН е резултат от процеса на стареене, отслабване на активността на хипоталамо-хипофизарната система, както и на Лайдиговите клетки. Този феномен се задълбочава при наличието на затлъстяване, захарен диабет, сърдечно-съдови и неопластични заболявания, по-често срещани се с напредване на възрастта (4).

С напредване на възрастта също така се увеличава нивото на свързващия половите хормони глобулин (SHBG), имащ пряко отношение към свързването и транспорта на тестостерона (5).

Промени в нивата на Т, освен поради възрастови изменения биха могли да настъпят и в хода на остри заболявания включително сърдечно-съдови инциденти. Wang и сътр. (6) потвърждават това в изследване върху мъже с остър миокарден инфаркт – значителна част от пациентите в момента на инцидента са с ниска стойност на Т спрямо контроли. Интерпретацията на тази наблюдения допълнително се усложнява от факта, че пациенти със захарен диабет тип 2 имат значимо по ниско ниво на Т (7, 8). Предполага се, че заг патогенезата на това нарушение стои сложна двупосочна връзка, състояща се от инсулинова резистентност, затлъстяване и дисрегулация на хипоталамо-хипофизарно-гонадната ос (ХХГ) (9, 10). Авторите предлагат възможна хипотеза защо при болните с глюкозни нарушения има по-голяма честота на хипотестостеронемията. Допуска се, че ниският Т може да е резултат от по-чувствителна ХХГ, което да води до намален отговор от тестисите към лутеинизиращия хормон (ЛН) в условия на стрес, комбинирано с намалена секреция на ЛН.

Въпреки доказателствата за асоциация между острия коронарен синдром (ОКС) и спада в Т, неясно остава дали нарушенията в гонадната функция са от значение за бъдещия сърдечно-съдов риск. Опит за решение на този проблем представлява проспективно проучване, в което G. Corona и сътр. (11) съобщават за по-нисък риск от нов сърдечно-съдов инцидент при пациенти с ниски нива на Т в острия период на ОКС. Вследствие на това авторите предполагат вероятен протективен ефект на хипогонадизма (хипотестостеронемията) при мъже с много висок

сърдечно-съдов риск, аналогично на синдрома на ниския Т3. Противоречиви данни постъпват от друго изследване, при което ниският серумен Т в острия период на ОКС се свързва със значимо по-голяма смъртност при пациенти над 65 г. (11).

Въпреки вероятната връзка между сърдечно-съдовия риск и гонадната функция, последната не е рутинна част от оценката при пациенти с исхемична сърдечна патология. Нивата на андрогените към момента не са част от калкулаторите, изчисляващи риска от нов сърдечно-съдов инцидент или смърт по сърдечно-съдова причина, както например е GRACE (The Global Registry of Acute Coronary Events) (12).

С оглед на описаните зависимости и нерешени проблеми си поставихме следната цел: изследване на честотата на хипотестостеронемията (ниски нива на Т) и асоциацията на общия, свободния и бионаличния Т с някои сърдечно-съдови рискови фактори, както и с резултата от рисковия калкулатор GRACE при пациенти с ОКС.

## Материали и методи

Пациентите бяха подбрани измежду хоспитализираните мъже в кардиологичните клиники предимно в УМБАЛ "Св. Марина", гр. Варна - общо 72-ма пациенти с ОКС на средна възраст 56,12 г. (възрастов обхват 36-70 г.) и 35 здрави контроли на средна възраст 54,22 г. (възрастов обхват 44-68 г.). В групата на пациентите кръв бе взета в интервала между 8 и 10 ч. сутрин преди хранене, 36-48 ч. след настъпване на миокардната исхемия. Включващи критерии за групата на пациентите бяха наличието на ОКС – остър миокарден инфаркт с или без ST-елевация и хоспитализация по повод нестабилна ангина пекторис. Миокардният инфаркт и нестабилната ангина са диагностицирани съгласно четвъртата международна дефиниция на миокардния инфаркт (13).

Изключващите критерии включваха наличието на некомпенсирани ендокринопатии, вкл. анамнеза за хипогонадизъм, прием на психотропни медикаменти, анаболни стероиди, хормонална терапия или прием на глюкокортикоиди през последните 6 месеца, съпътстващи остри заболявания и скорошни операции. За групата на контролите допълнителен изключващ критерий бе анамнеза за артериална хипертония и исхемична болест на сърцето. При дефиниране на долната граница на Т бе използвано ниво 9.2 pmol/l, съобразно препоръките за добра клинична практика на Българско дружество по Ендокринология и на „Ендокринното дружество“ в САЩ (14, 15). За долна граница на свободния Т бе приета 0.220 pmol/l (16).

Рисковият калкулатор GRACE цели идентифициране на пациентите с най-голям риск от смърт или нов миокарден инфаркт за шест-месечен период след настъпване на ОКС (12, 17, 18). Рисковите фактори включват тези, използвани при изчисляването на GRACE, както и тютюнопушене, дислипидемия, възраст над 50 г. и придружаващ захарен диабет тип 2.

Албумин е изследван, използвайки анализатор Siemens Advia 1800. Тестостерон и SHBG са изследвани чрез анализатор Siemens IMMULITE 2000. Свободната и бионаличната фракция на Т са установени, използвайки изчислителен метод въз основа на общ Т, SHBG и албумин (19).

Статистическият анализ на данните бе проведен с SPSS версия 24. Бе използван t-критерий на Стюдънт и Ман-Уитни тест. Корелационните коефициенти бяха изчислени по методите на Спирман и Пирсън. За всички тестове бе приета статистическа значимост при  $p < 0.05$ .

### Резултати

Разпределението на рисковите фактори бе изследвано за двете групи. Не се установява статистически значима разлика между тях по отношение на честотата на тютюнопушенето

( $\chi^2(1)=1.101, p=0,2$ ) при съответно 60% (n=51) в контролната и 72,9% (n=51) в група на ОКС (Табл. 1). Не се отчете и статистически значима разлика във възрастта и индекса на телесна маса (ИТМ).

На Таблица 1 е представено разпределението на рисковите фактори в групата на болните с ОКС. В хода на статистическия анализ не бе установена разлика в нивата на фракциите на Т в зависимост от възрастовата категория, наличието на захарен диабет, класа по Килип, тютюнопушенето или систолното артериално налягане ( $p > 0,05$ ).

От проведенения статистически анализ се установи значима разлика в нивата на общия, свободния и бионаличния Т между групите на ОКС и контролите Липсва значимо различие в стойността на SHBG ( $30,71 \pm 10,88$  pmol/L спрямо  $31,55 \pm 10,46$  pmol/L,  $p > .05$ ) (Табл. 2).

Използвайки прагова стойност за общия Т от 9,2 pmol/l установихме че 52,78% от пациентите в групата на ОКС са били класифицирани като такива с нисък Т. За групата контролите това са 29,41% (Фиг. 1А). Използвайки като критерии свободния Т  $< 0,220$  pmol/l, то 65,28% от пациентите в групата на ОКС биха били класифицирани като такива с хипотестостеронемия и 45,71% от контролите (Фиг. 1Б). Между

		ОКС (n=72)
Тютюнопушене		N=51 72.9%
Захарен диабет тип 2		N=16 22.5%
Друго ACC3		N=9 12.85%
Дислипидемия		N=72 100%
Прием на статин		N=19 26.8%
ST-елевация		N=53 74.6%
ХСН		N=8 11.27%
Клас Килип	1	N=67 93.1%
	2	N=2 2.8%
	3	N=3 4.1%
Grace score		94.38±25.89 (86.95-101.82)
Систолно АН - mmHg		138.70 ±28.04 (132.06-145.34)
Тропонин - ng/ml		58.96±69.18 (42.71-75.22)
Креатинин - mmol/L		94.956 ± 29.07 (88.13-101.79)
HDL холестерол - mmol/L		1.15 ±0.34 (1.07-1.23)
LDL холестерол - mmol/L		3.46 ±1.23 (3.17-3.75)
Общ холестерол - mmol/L		5.45 ±1.53 (5.1-5.81)
Триглицериди - mmol/L		1.91 ±1 (1.67-2.15)

**Таблица 1.**

Исходни рискови характеристики на пациентите.

Параметричните показатели са представени със средна стойност,  $\pm$  стандартно отклонение и 95% доверителен интервал в скоби.

Съкращения:

АН- артериално налягане, ACC3 – атеросклеротично сърдечно-съдово заболяване, ХСН – хронична сърдечна недостатъчност.

**Таблица 2.**

Разлики между групата на пациентите и контролите.

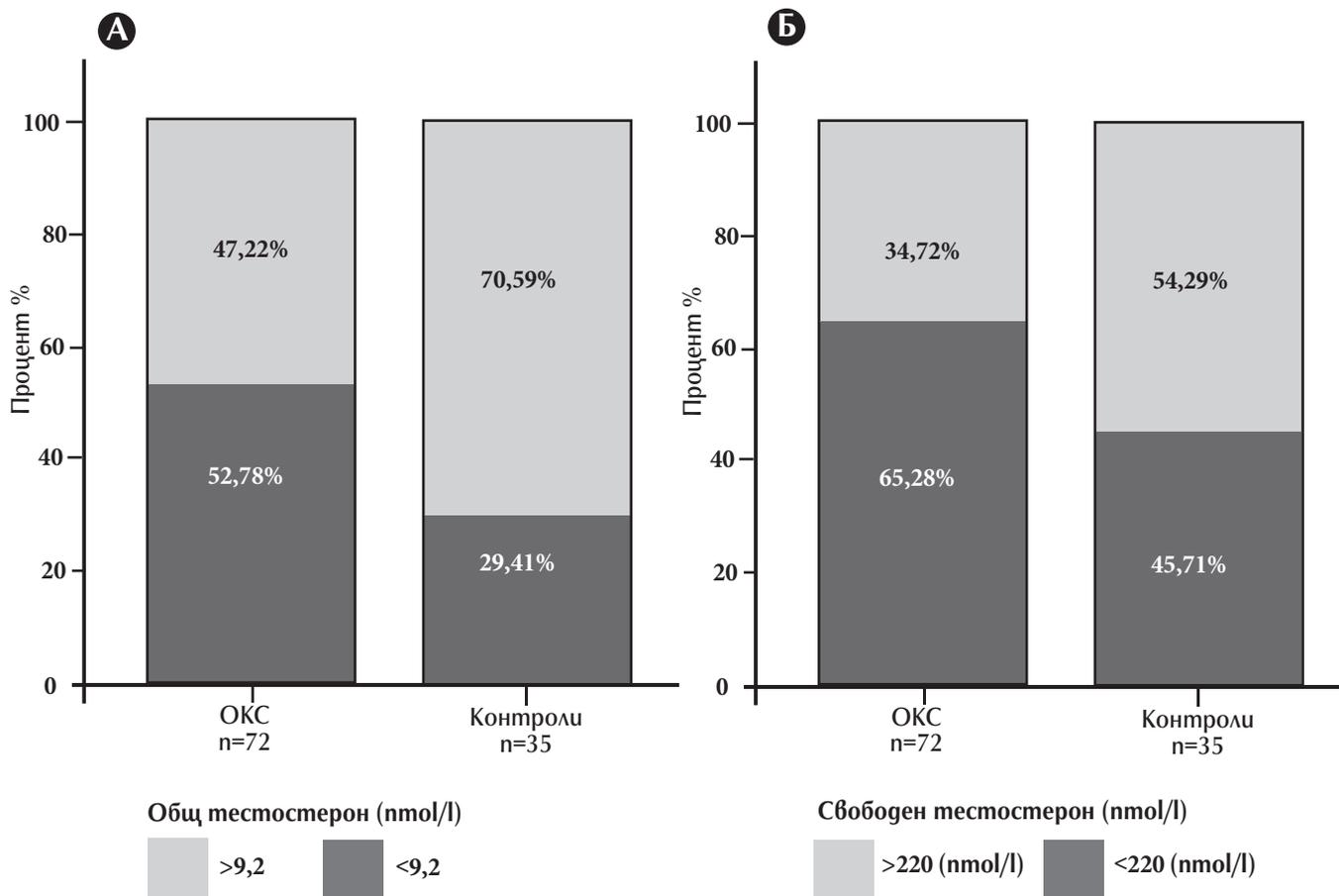
Представени са средни стойности, стандартно отклонение, в скоби – 95% интервал на достоверност.

Съкращения: ns –  $p > 0.05$ ;  
ИТМ – индекс на телесна маса;  
ОКС – остър коронарен синдром;  
SHBG – секс-хормон свързващ глобулин.

	ОКС (N=72)	Контроли (N=35)	p-стойност
<b>Възраст (г.)</b>	56.12 ±9.73 (53.73-58.51)	54.22 ±7.23 (51.61-56.83)	ns
<b>ИТМ (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28.54±4.37 (27.47-29.62)	28.98 ±3.52 (27.7-30.25)	ns
<b>T (nmol/L)</b>	8.97±4.11 (8.01-9.94)	11.1±2.38 (10.26-11.93)	<b>0.001</b>
<b>SHBG (nmol/L)</b>	30.71±10.88 (28.16-33.27)	31.55±10.46 (27.95-35.14)	ns
<b>Свободен T (nmol/L)</b>	0.19±0.09 (0.169-0.211)	0.22±0.04 (0.21-0.24)	<b>0.006</b>
<b>Бионаличен T (nmol/L)</b>	4.41±2.15 (3.902-4.912)	5.60±0.89 (5.28-5.92)	<b>0.001</b>

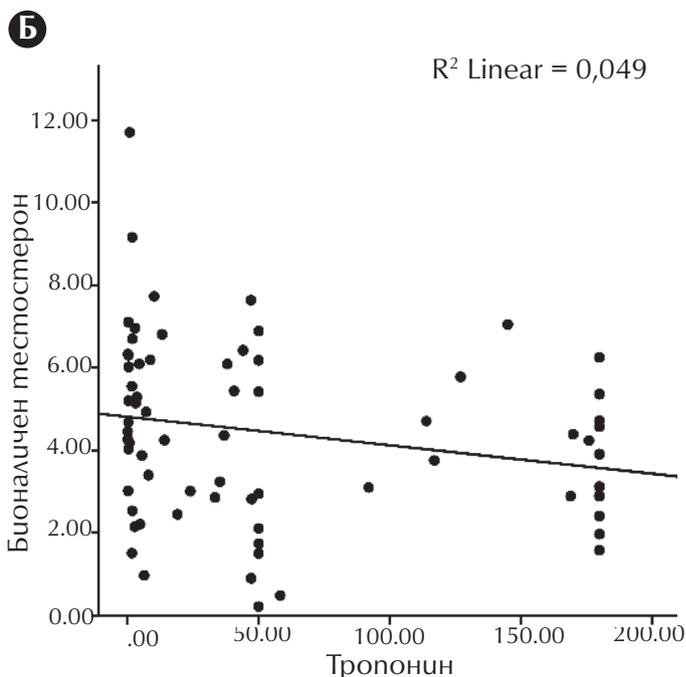
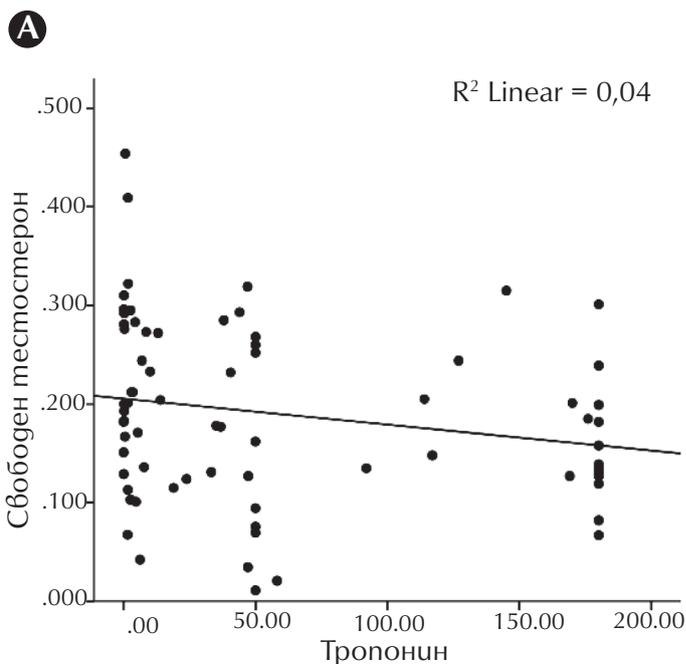
**Фигура 2.**

Процентно разпределение на пациентите в зависимост от нивото на T. А) общ тестостерон; Б) изчислен свободен T.



**Фигура 2.**

- Корелации между А) тропонин и свободен Т;
- Б) тропонин и бионаличен Т;
- В) GRACE и свободен Т;
- Г) CRACE и бионаличен Т.



групите на ОКС и контролите се установява статистически значима разлика в честотата на хипотестостеронемията, използвайки както критерии както общия ( $\chi^2(1)=5,089, p=0,024$ ) (Фиг. 1А) така и свободния Т ( $\chi^2(1)=3,723, p=0,05$ ) (Фиг. 1Б).

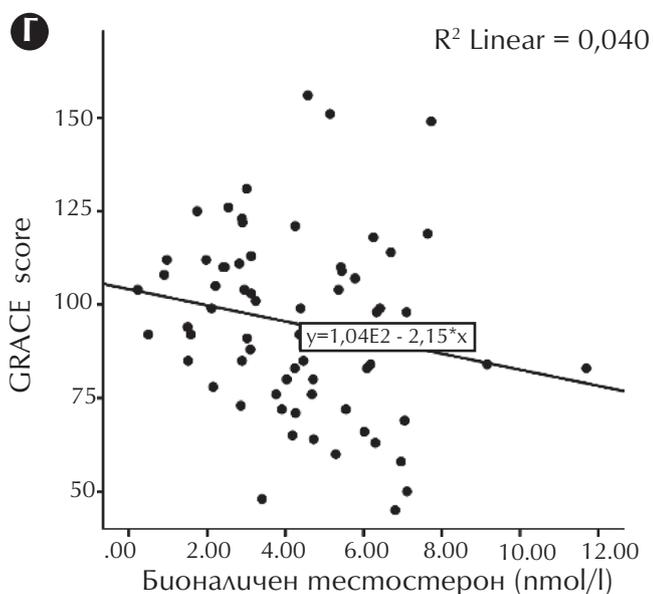
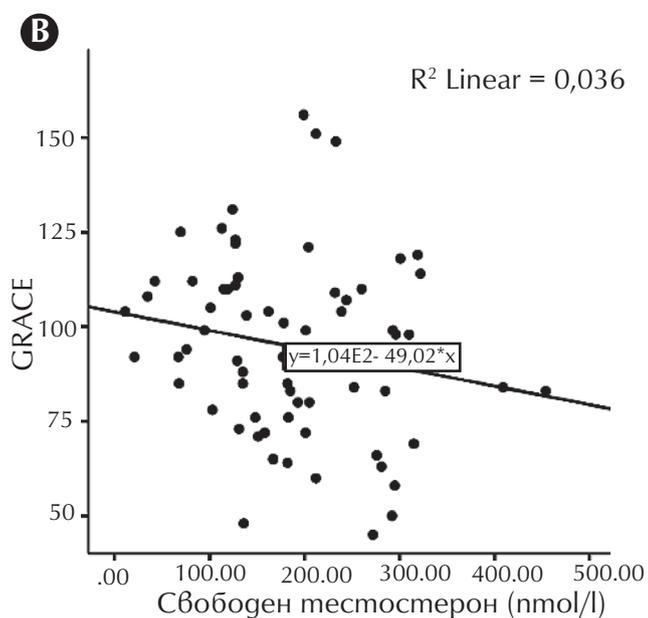
Установява се статистически значима, слаба, негативна корелация между стойността на тропонина в групата на ОКС както със свободния ( $r_s=-0,266, p=0,024$ ), така и с бионаличния Т ( $r_s=-0,293, p=0,012$ ) (Фиг. 2А и 2Б). Асоциация се отчита и между бионаличния Т и GRACE ( $r_s=-0,262, p=0,028$ ), както и между свободния Т и резултата от GRACE ( $r_s=-0,239, p=0,047$ ). Стойността на SHBG корелира положително с резултата за GRACE ( $r=0,312, p=0,008$ ) и възрастта ( $r=0,330, p=0,005$ ) (Табл. 3; Фиг. 2В и 2Г). Нивото на SHBG асоциира положително със стойността на общия Т ( $r=0,364, p=0,002$ ). В настоящата извадка липсва асоциация между ИТМ и общия Т ( $r=-0,205, p=0,099$ ). Не се установи статистически значима зависимост между показателите на липидния профил и някоя от фракциите на тестостерона или SHBG.

След корекция спрямо възрастта корелацията между SHBG и GRACE губи своята значимост ( $r=0,078, p=0,524$ ). Асоциацията между свободния Т и GRACE запазва статистическата си значимост, дори и след корекция спрямо възрастта ( $r=-0,245, p=0,043$ ), докато тази между GRACE и бионаличния Т е с гранична статистическа значимост ( $r=-0,230, p=0,058$ ).

**Обсъждане**

С оглед на описаните резултати идентифицираме свободния Т като хормонален маркер, най-тясно свързан със сърдечно-съдовия риск, изразен чрез GRACE. Освен това най-силна зависимост между големината на миокардната некроза (тропонина) се отбелязва за свободния и бионаличния Т.

Изследваните пациенти са във възраст, в която се очаква хипогонадизъм с късно начало, спад в нивата на общия Т вследствие на заболявания, фактори на средата, физиологичния процес на стареене и другите хормонални системи. Във връзка с това са провеждани проспективни проучвания, предложени са коригирани според възрастта референтни граници (1, 20). Тези наблюдения, както и вариабилната клинична картина на мъжкия хипогонадизъм, правят характери-



зирането му с ясен биохимичен показател трудно.

Както в групата на контролите, така и в тази на пациентите стойностите на общия Т са близки до долната референтна граница (средно 8,9 при пациентите и 11,1 pmol/l при контролите). Именно при тези стойности свободният Т е по-информативен за функционалното състояние на гонадите (14, 21). В случая използвахме прагова стойност от 9.2 pmol/l за общия Т или 0,220 pmol/l за свободния Т, установявайки значимо по-голям брой пациенти с нисък Т в групата

на ОКС. Използвайки свободния Т като критерии установяваме значимо нарастване на честотата на хипотестостероенемията от 52,8% на 65,3% в групата на ОКС.

Индикация, че свободният Т е по-информативен маркер от общия откриваме и в корелацията им с тропонина. Свободният и бионаличният Т корелират негативно с големината на инфарктната зона (тропонина). Тази корелация трябва да се интерпретира, имайки предвид чувствителността на лабораторния метод за измерване на тропонин до максимум 180 ng/ml. Това наблюдение дава основание да смятаме, че свободният и бионаличният Т по-добре отразяват тежестта на ОКС. Подробна асоциация, но за общия Т с тропонина, е установена и от Genser и сътр. (22).

За разлика от нашето проучване, в други изследвания е описана зависимост между тежестта на коронарната атеросклероза и нивата на общия Т. В едно от тях това е направено за стабилна артериална коронарна болест и за ОКС, използвайки ангиографски показатели (23). В други изследвания е установена асоциация между броя на засегнатите клонове и тежестта на артериалната коронарна болест, измерена чрез SYNTAX и нивата на Т (24, 25). В българско проучване на Семерджиева (26), от друга страна, не е установена асоциация между стойността на общия Т или DHEA-S със нивата на тропонина или с резултата от SYNTAX.

Освен това установихме липса на асоциация между ИТМ и общия Т в групата на пациентите. Допускаме, че това е следствие от спада на Т, настъпил в хода на ОКС, нарушавайки известната зависимост.

Другият биохимичен показател, пряко свързан с Т е SHBG – основният свързващ протеин за тестостерона в циркулацията (27). Установихме, че SHBG демонстрира позитивна асоциация с краткосрочния риск от сърдечно-съдова смърт и нов миокарден инфаркт, изразен чрез резултата от рисковия калкулатор GRACE. Известно е линейното повишаване на SHBG с възрастта при мъжкия пол (6), наблюдение, което се подкрепя и от нашите данни.

Възрастта е един и от факторите, участващи в изчисляването на GRACE. След корекция спрямо възрастта, корелацията между двата показателя загуби статистическата си значимост.

**Таблица 3.** Корелации между биохимични показатели и нива на андрогените и SHBG.

	<i>HDL</i>	<i>LDL</i>	<i>ОХ</i>	<i>ТГ</i>	<i>тропонин</i>	<i>GRACE</i>	<i>възраст</i>
<b>Общ Т</b> <b>&lt;9,2 nmol/L</b>	0,199 p=.096	0,032 p=.793	0,059 p=.623	0,044 p=.724	-0,175 p=.143	-0,026 p=.829	0,107 p=.370
<b>Свободен Т</b> <b>&lt;0,220 nmol/L</b>	0,081 p=.504	-0,019 p=.872	0,108 p=.366	-0,026 p=.836	-0,175 p=.142	-0,099 p=.414	0,004 p=.977
<b>Общ Т - nmol/L</b>	0,222 p=.063	-0,033 p=.785	0,013 p=.916	-0,091 p=.459	-0,217 p=.067	-0,135 p=.266	0,093 p=.437
<b>Свободен Т - nmol/L</b>	0,149 p=.214	-0,067 p=.577	0,016 p=.895	-0,047 p=.705	<b>-0.266*</b> <b>p=0.024</b>	<b>-0.239*</b> <b>p=0.0047</b>	-0,033 p=.785
<b>Бионаличен Т - nmol/L</b>	0,188 p=.116	-0,092 p=.444	0,030 p=.803	0,025 p=.840	<b>-0.293*</b> <b>p=0.012</b>	<b>-0.262*</b> <b>p=0.028</b>	-0,049 p=.681
<b>SHBG - nmol/L</b>	0,182 p=.130	0,182 p=.128	0,036 p=.764	-0,223 p=.068	0,050 p=.675	<b>0.312*</b> <b>p=0.008</b>	<b>0.330*</b> <b>p=0.005</b>

Легенда: ОХ – общ холестерол, ТГ – триглицериди; ТТ < 9,2 – общ тестостерон под 9,2 nmol/l; ТТ < 0,220 – свободен тестостерон под 0,220 nmol/l; \* – значима корелация

Въпреки това връзката между нивата на SHBG и смъртността по сърдечно-съдови причини е изследвана в други проспективни, кохортни проучвания при мъже на възраст между 40 и 69 г. (28). Авторите установяват, че по-високите нива на SHBG са свързани с риска от смърт, независимо от нивата на Т, наличието на тиреоидна дисфункция, чернодробни заболявания и прием на антиконвулсанти. За разлика от литературните данни в нашето изследване не успяхме да свържем нивата на SHBG със шестмесечния риск при мъже с ОКС.

От друга страна корелацията на свободния Т с GRACE запазва статистическата си значимост дори и след корекция спрямо възрастта. Тъй като в нашето изследване използвахме изчисления свободен и бионаличен тестостерон техните концентрации се пряко следствие от нивата на SHBG и общия Т.

По тази причина бихме могли да допуснем, че SHBG има връзка с сърдечно-съдовия риск до толкова доколкото определя нивата на свободния Т. До сходно заключение достигат и други изследователи сравнявайки смъртността при пациенти със захарен диабет в зависимост от нивата на SHBG и общия тестостерон (29).

Дали свободният Т модулира риска не би могло да бъде изяснено с настоящото изследване. Липсата на статистически значима корелация между общия Т и рисковата характеристика и между бионаличния Т и GRACE след контролиране спрямо възрастта още веднъж определя свободния Т като по-подходящ биомаркер в условията на ОКС.

Тъй като SHBG има и други детерминанти, освен възрастта, трябва да се допусне възможността SHBG да се асоциира със смъртността по причини различни от възрастово, обусловеното му нарастване.

### Заклучение

На базата на представената информация, можем да заключим, че свободният Т е хормоналният маркер, най-тясно свързан със сърдечно-съдовия риск, изразен чрез GRACE. Освен това, наблюдава се силна връзка между големината на миокардната некроза, измерена чрез тропонина, и нивата на свободния и бионаличния Т. Тези резултати подчертават потенциалното значение хормоналните маркери в прогнозирането на сърдечно-съдовия риск.

# Incidence of Low Testosterone Levels in Patients with Acute Coronary Syndrome and its Association with Cardiovascular Risk Factors

Shishkov, Savi R.<sup>1</sup>, Hristozov, Kiril H.<sup>1</sup>, Angelov, Atanas A.<sup>2</sup>, Slavcheva, Svetoslava E.<sup>2</sup>, Bocheva, Yana D.<sup>3</sup>, Boyadzhieva, Mila B.<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> Second Department of Internal Diseases,

<sup>2</sup> First Department of Internal Diseases,

<sup>3</sup> Department Clinical Laboratory, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

## Address for correspondence:

Shishkov, Savi R.,

UMAHT „St. Marina“ Varna,  
bul. „Hristo Smirnenski“ 1, Varna 9002,  
email: savirshishkov@gmail.com

Submitted: 19. 07. 2023

Revised: 23. 07. 2023

Accepted: 25. 07. 2023

## Abstract

**Introduction:** The decline in testosterone (T) levels in males is a phenomenon increasing with age and a frequent finding in the course of acute illness. As the incidence of cardiovascular disease increases with age, the association of sex steroids with cardiovascular risk is of practical interest.

**Objective:** The aim was to investigate the incidence of hypotestosteronemia and the association of total free and bioavailable T with some cardiovascular risk factors, as well as with the GRACE risk score in patients with acute coronary syndrome (ACS).

**Materials and Methods:** In the acute period after the onset of ACS, total testosterone, SHBG and calculated free and bioavailable testosterone were measured in the patients. Cardiovascular risk profile data were taken from medical records.

**Results:** A total of 72 patients with ACS with a mean age of 56.12 years and 35 healthy controls with a mean age of 54.22 years were included in the study. Patients with ACS had significantly lower levels of all testosterone fractions compared to controls (for total, free and bioavailable T,  $p < 0,05$ ). Subnormal values of total T were found in 52,78% of patients with ACS (versus 29,4% in controls,  $p < 0,05$ ) and for free T in 65,28% (versus 45,78% in controls,  $p < 0,05$ ) Negative correlations were found between free T and troponin ( $r = -0,266$   $p = 0,024$ ) as well as between free T and GRACE, which persisted even after adjusting for age ( $r = -0,245$ ,  $p = 0,043$ ).

**Conclusion:** In view of the results described, we identify free T as the hormonal marker most closely associated with cardiovascular risk as expressed by GRACE. Furthermore, we found a significant association between the magnitude of myocardial necrosis (troponin) and free and bioavailable testosterone.

**Key words:** testosterone, free testosterone, androgens, cardiovascular risk, acute coronary syndrome

## Introduction

In the course of aging in males, a decline in testosterone (T) levels is observed without anatomical alterations in the hypothalamic-pituitary axis (1). Such functional hypogonadism against a background of low T levels and symptoms of androgen insufficiency can be categorized as late-onset hypogonadism (LOH) (2, 3). LOH results from the aging process, a weakening of the activity of the hypothalamic-pituitary axis as well as Leydig cells. This phenomenon is exacerbated in the

presence of obesity, diabetes, cardiovascular and neoplastic diseases more common with advancing age (4).

The level of sex hormone binding globulin (SHBG), directly involved in testosterone binding and transport, also increases with age (5).

Changes in T levels, in addition to age-related changes, could occur in the course of acute illness including cardiovascular events. Wang and associates (6) confirmed this in a study of men with acute myocardial infarction: a significant proportion of patients had low T at the time of the incident compared with controls.

Interpretation of this observation is further complicated by the fact that patients with type 2 diabetes mellitus have significantly lower T levels (7, 8). It has been suggested that a complex bidirectional relationship consisting of insulin resistance, obesity, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis is behind the pathogenesis of this disorder (9, 10). The authors offer a possible hypothesis as to why patients with glucose disorders have a higher incidence of hypothyroidism. It has been hypothesized that low T may result from a more sensitive hypothalamic-pituitary-gonadal axis, leading to a reduced response from the testes to luteinizing hormone (LH) under conditions of stress combined with reduced LH secretion.

Despite evidence of an association between ACS and T decline, it remains unclear whether impairments in gonadal function are relevant to future cardiovascular risk. In a prospective study G. Corona (11) and associates report lower risk of a new cardiovascular event in patients with hypotestosteronemia in the acute period of ACS. Consequently, the authors suggest a likely protective effect of hypogonadism (hypotestosteronemia) in men at very high cardiovascular risk, analogous to the low T3 syndrome. Conflicting data come from another study in which low serum testosterone in the acute period of ACS was associated with significantly greater mortality in patients over 65 years of age (11).

Calculators estimating the risk of a new CV event or death from a cardiovascular cause are available, one of many being GRACE (The Global Registry of Acute Coronary Events) (12). These risk calculators do not include an assessment of sexual function.

In view of the described dependencies and unresolved issues, we set the following objective: To investigate the association of total free and bioavailable T with some cardiovascular risk factors and with the GRACE risk calculator score.

## Materials and Methods

The patients were selected from among hospitalized men in the cardiology clinics mainly at the University Hospital „St. Marina“ in Varna – a total of 72 patients with ACS with an average age of 56,12 years (range 36-70 years) and 35 controls with an average age of 54,22 years (range 44-68 years). The control group was recruited mainly from outpatients. In the patient group, blood was drawn between 8 and 10 am before meals, 36-48 h after the onset of myocardial ischemia. Inclusion criteria for the patient group were the presence of ACS (acute myocardial infarction with or without ST-elevation and hospitalization for unstable angina pectoris). Myocardial infarction and unstable angina are diagnosed according to the fourth international definition of myocardial infarction (13).

Exclusion criteria were the presence of uncompensated endocrinopathies, including a history of hypogonadism, intake of psychotropic medications, anabolic

steroids, hormone therapy or glucocorticoid intake in the last 6 months, concomitant acute illnesses, and recent surgeries. For the control group, history of arterial hypertension and ischemic heart disease was an additional exclusion criterion. In defining the lower limit of testosterone, 9,2 nmol/l was used, according to the recommendations for good clinical practice of the Bulgarian Society of Endocrinology and of the „Endocrine Society“ in the USA (14, 15). The lower limit of free T was taken as 0,220 nmol/l (16).

The GRACE risk calculator aims to identify patients at highest risk of death or new myocardial infarction over a six-month period after the onset of ACS (12, 17, 18). Risk factors include those used in the GRACE calculation as well as smoking, dyslipidemia, age older than 50 years, and type 2 diabetes mellitus.

Albumin was analysed using a Siemens Advia 1800 analyser. Testosterone and SHBG were analysed using a Siemens IMMULITE 2000 analyser. Free and bioavailable T fraction were determined using the computational method based on measurement of total T, SHBG and albumin (17).

Statistical analysis of the data was performed using SPSS version 24. Student's t-criterion and Mann-Whitney test were used. Correlation coefficients were calculated by the non-Spearman and Pearson methods. Statistical significance at  $p < 0,05$  was assumed for all tests.

## Results

The distribution of risk factors was examined for both groups. There was no statistically significant difference between them in terms of smoking prevalence ( $\chi^2(1)=1,101$ ,  $p=0,2$ ) with 60% ( $n=51$ ) in the control group and 72,9% ( $n=51$ ) in the OCS group, respectively (Table 1). There was also no statistically significant difference in age and body mass index.

Table 1 shows the distribution of risk factors in the group of patients with ACS. In the course of statistical analysis, there was no difference in the levels of testosterone fractions according to age category, presence of diabetes mellitus, Killip class and smoking ( $p > 0,05$ ). There was also no statistically significant correlation with the value of systolic blood pressure. ( $p > 0,05$ )

Statistical analysis revealed a significant difference in total, free and bioavailable testosterone levels between the ACS groups and controls. There was no significant difference in SHBG values ( $30,71 \pm 10,88$  nmol/L versus  $31,55 \pm 10,46$  nmol/L,  $p > 0,05$ ) (Table 2).

Using a threshold value for total testosterone of 9,2 nmol/l, we found that 52,78% of patients in the ACS group would have been classified as having hypotestosteronemia. For the control group, this was 29,41% (Fig. 1A). When using free testosterone  $< 0,220$  nmol/l as criterion, 65,28% of patients in the ACS group would be classified as having hypotestosteronemia compared to 45,71% of controls (Fig. 1B). There was a statistically significant difference in the incidence of hypotestosteronemia between the ACS and control groups using

both total ( $\chi^2(1) = 5,089, p=0,024$ ) (Fig. 1A) and free T ( $\chi^2(1) = 3,723, p=0,05$ ) as criteria (Fig. 1B).

There was a statistically significant, weak, negative correlation between troponin values in the ACS group and both free ( $r_s = -0,266, p=0,024$ ) and bioavailable testosterone ( $r_s = -0,293, p=0,012$ ) (Fig. 2A and 2B). An association was also observed between bioavailable testosterone and GRACE ( $r_s = -0,262, p=0,028$ ), as well as between free T and GRACE score ( $r_s = -0,239, p=0,047$ ). The SHBG value was positively correlated with the GRACE score ( $r = 0,312, p=0,008$ ) and age ( $r = 0,330, p=0,005$ ) (Table 3) (Fig. 2C and 2D). SHBG level was positively associated with the value of total T ( $r = 0,364, p=0,002$ ). In the present cohort, there was no association between BMI and total T ( $r = -0,205, p=0,099$ ). There was no statistically significant correlation between lipid profile parameters and any of the testosterone fractions or SHBG.

After adjustment for age, the correlation between SHBG and GRACE loses its significance ( $r = 0,078, p=0,524$ ). However, the association between free T and GRACE retains its statistical significance even after adjustment for age ( $r = -0,245, p=0,043$ ), while that between GRACE and bioavailable T is of borderline statistical significance ( $r = -0,230, p=0,058$ ).

## Discussion

In light of the results described, we identify free T as the hormonal marker most closely associated with

cardiovascular risk as expressed by GRACE. Furthermore, the strongest correlation between the magnitude of myocardial necrosis (troponin) is observed for free and bioavailable T.

The patients studied were at an age where late-onset hypogonadism, a decline in total T levels due to disease, environmental factors, the physiological aging process, and other hormonal systems would be expected. In this regard, prospective studies have been conducted and age-adjusted reference ranges have been proposed (18, 19). These observations, as well as the variable clinical presentation of male hypogonadism, make its characterization with a clear biochemical marker difficult.

In both the control and patient groups, total T values were close to the lower reference limit (mean 8,9 in patients and 11,1 mmol/l in controls). It is at these values that free T is more informative about the functional status of the gonads (20, 21). In this case, we used a threshold value of 9,2 nmol/l for total T or 0,220 nmol/l for free T, finding a significantly higher number of patients with hypotestosteronemia in the OCS group. Using free T as criteria, we found a significant increase in the incidence of hypotestosteronemia from 52,8% to 65,3% in the ACS group.

An indication that free T is a more informative marker than total T is also found in the correlation between T and troponin. Free and bioavailable T correlate negatively with the size of the infarction zone (troponin level).

		ACS (n=72)
Smoking		N=51 72.9%
Diabetes mellitus type		N=16 22.5%
Another ASCVD		N=9 12.85%
Dyslipidemia		N=72 100%
Statin intake		N=19 26.8%
ST-elevation		N=53 74.6%
CHI		N=8 11.27%
Kilip class 1	1	N=67 93.1%
	2	N=2 2.8%
	3	N=3 4.1%
Grace score		94.38±25.89 (86.95-101.82)
Systolic RR - mmHg		138.70 ±28.04 (132.06-145.34)
Troponin - ng/mL		58.96±69.18 (42.71-75.22)
Creatinin - µmol/L		94.956 ± 29.07 (88.13-101.79)
HDL cholesterol - mmol/L		1.15 ±0.34 (1.07-1.23)
LDL cholesterol - mmol/L		3.46 ±1.23 (3.17-3.75)
Total cholesterol- mmol/L		5.45 ±1.53 (5.1-5.81)
Triglycerides - mmol/L		1.91 ±1 (1.67-2.15)

**Table 1.**

Baseline risk characteristics of patients.

Parametric values are presented with mean, ±standard deviation and 95% confidence interval in parentheses.

Abbreviations:

ASCVD - atherosclerotic cardiovascular disease;

CHI - chronic heart insufficiency.

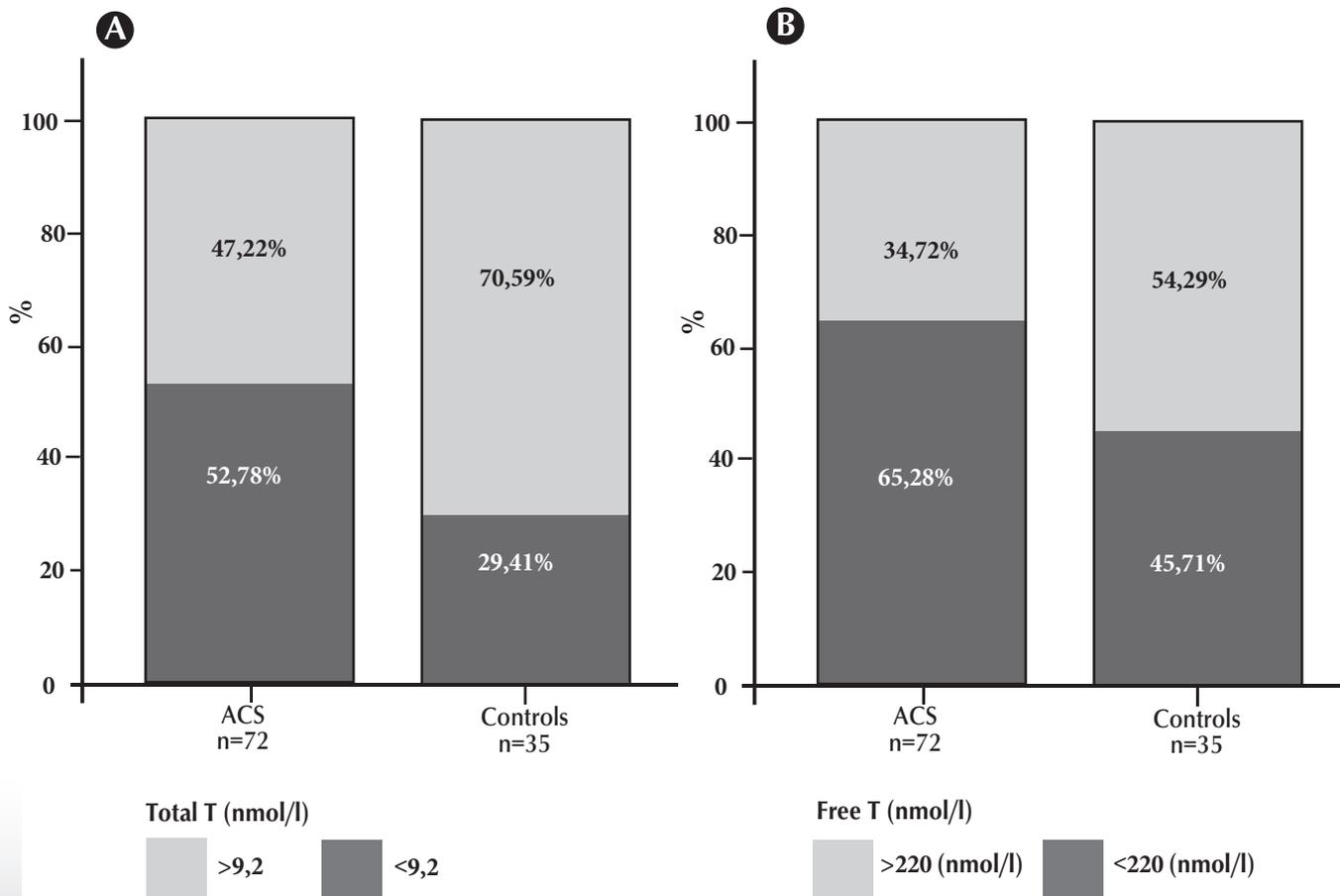
**Table 2.**

Group differences between patients and controls.

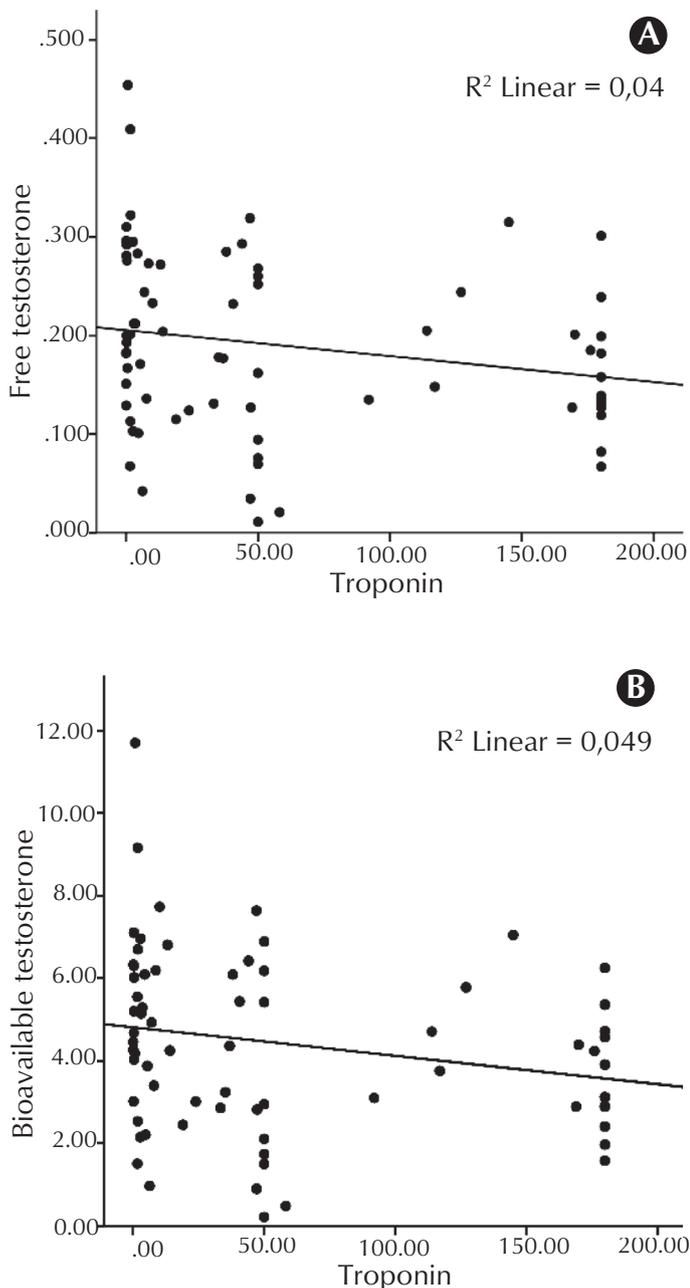
Differences in hormonal indices between the studied groups. Given are: mean value,  $\pm$ SD, in brackets 95% confidence interval. Abbreviations: ns –  $p > 0,05$ ; BMI, body mass index; ACS, acute coronary syndrome. SHBG, sex hormone binding globulin, in brackets 95% confidence interval.

	ACS (N=72)	Controls (N=35)	p-value
Age (years)	56.12 $\pm$ 9.73 (53.73-58.51)	54.22 $\pm$ 7.23 (51.61-56.83)	ns
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.54 $\pm$ 4.37 (27.47-29.62)	28.98 $\pm$ 3.52 (27.7-30.25)	ns
T (nmol/L)	8.97 $\pm$ 4.11 (8.01-9.94)	11.1 $\pm$ 2.38 (10.26-11.93)	<b>0.001</b>
SHBG (nmol/L)	30.71 $\pm$ 10.88 (28.16-33.27)	31.55 $\pm$ 10.46 (27.95-35.14)	ns
Free T (nmol/L)	0.19 $\pm$ 0.09 (0.169-0.211)	0.22 $\pm$ 0.04 (0.21-0.24)	<b>0.006</b>
Bioavailable T (nmol/L)	4.41 $\pm$ 2.15 (3.902-4.912)	5.60 $\pm$ 0.89 (5.28-5.92)	<b>0.001</b>

**Figure 1.** Percentage distribution of patients according to T level. A) total T; B) calculated free T.



**Figure 2.** Correlation between T fractions, GRACE, and troponin



This correlation should be interpreted considering the sensitivity of the laboratory method to measure troponin up to a maximum of 180 ng/ml. This observation gives reason to believe that free and bioavailable T better reflect the severity of ACS. A similar association, but of total T with troponin, was found by Gencer et al (22, 23).

In contrast to the present study, others have described a relationship between the severity of coronary atherosclerosis and total T levels. In one of them, this was done for stable arterial coronary disease and for ACS using angiographic indices (24). Other investigators have found an association between the

number of affected branches and the severity of arterial coronary disease measured by SYNTAX and T levels (25, 26). In a Bulgarian study by Semerdjieva (27), on the other hand, no association was found between total T or DHEA-S values with troponin levels or with the SYNTAX score.

Furthermore, we found no association between BMI and total T in the patient group. We hypothesized that this was a consequence of the decline in T that occurred during the course of ACS, distorting the well-known relationship.

The other biochemical marker directly related to T is SHBG, the major binding protein for testosterone in the circulation. 28 We found that SHBG demonstrated a positive association with the short-term risk of cardiovascular death and new myocardial infarction as expressed by the GRACE risk calculator score. A linear increase in SHBG with age in male sex is known (6), an observation that is supported by our data.

Age is also one of the factors involved in the GRACE calculation. After adjustment for age, the correlation between the two parameters lost its statistical significance.

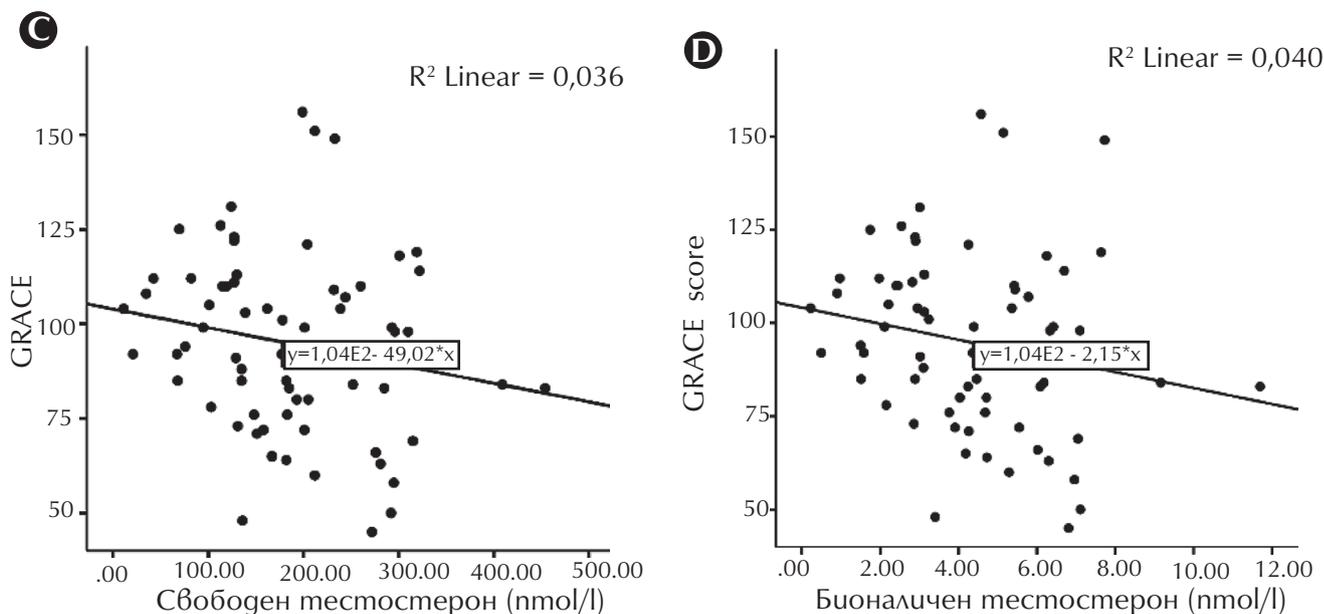
However, the association between SHBG levels and cardiovascular mortality has been examined in other prospective, cohort studies in men aged 40 to 69 years (29). The authors found that higher SHBG levels were associated with risk of death, independent of T levels, presence of thyroid dysfunction, liver disease, and anticonvulsant intake. On the basis of these results, we would suggest that plasma SHBG protein concentration could possibly be a predictor of long-term cardiovascular risk in stable c-s patients but not of 6-month risk in patients with ACS in view of our results.

On the other hand, the correlation of free T with GRACE maintained its statistical significance even after adjustment for age. Since in our study we used calculated free and bioavailable testosterone their concentrations are a direct consequence of SHBG and total T levels.

For this reason, we could assume that SHBG is related to cardiovascular risk insofar as it determines free T levels. Other investigators have reached a similar conclusion comparing mortality in patients with diabetes mellitus in relation to SHBG and total T levels (30).

Whether free T modulates risk could not be clarified by the present study. The lack of a statistically significant correlation between total T and risk characteristics and between bioavailable T and GRACE after controlling for age once again identifies free T as a more appropriate biomarker in the setting of ACS.

Because SHBG has other determinants besides age, the possibility that SHBG may be associated with mortality for reasons other than its age-related increase must be considered.



Correlations between A) troponin and free T; B) troponin and bioavailable T; C) GRACE and free T; D) CRACE and bioavailable T.

**Table 3.** Correlation between biochemical parameters and androgen and SHBG levels.

	<i>HDL</i>	<i>LDL</i>	<i>Total Ch</i>	<i>TG</i>	<i>Troponin</i>	<i>GRACE</i>	<i>Age</i>
<i>TT</i> <i>&lt;9.2 nmol/L</i>	0,199 p=.096	0,032 p=.793	0,059 p=.623	0,044 p=.724	-0,175 p=.143	-0,026 p=.829	0,107 p=.370
<i>Free T</i> <i>&lt;0.220 nmol/L</i>	0,081 p=.504	-0,019 p=.872	0,108 p=.366	-0,026 p=.836	-0,175 p=.142	-0,099 p=.414	0,004 p=.977
<i>Total T - nmol/L</i>	0,222 p=.063	-0,033 p=.785	0,013 p=.916	-0,091 p=.459	-0,217 p=.067	-0,135 p=.266	0,093 p=.437
<i>Free T - nmol/L</i>	0,149 p=.214	-0,067 p=.577	0,016 p=.895	-0,047 p=.705	<b>-0.266*</b> <b>p=0.024</b>	<b>-0.239*</b> <b>p=0.047</b>	-0,033 p=.785
<i>Bioavailable T - nmol/L</i>	0,188 p=.116	-0,092 p=.444	0,030 p=.803	0,025 p=.840	<b>-0.293*</b> <b>p=0.012</b>	<b>-0.262*</b> <b>p=0.028</b>	-0,049 p=.681
<i>SHBG - nmol/L</i>	0,182 p=.130	0,182 p=.128	0,036 p=.764	-0,223 p=.068	0,050 p=.675	<b>.0312*</b> <b>p=0.008</b>	<b>0.330*</b> <b>p=0.005</b>

Legend: *total Ch* - total cholesterol, *TG* - triglycerides; *TT < 9,2* - free testosterone below 9,2 nmol/l; *FT < 0,220* - free testosterone below 0,220 nmol/l; \* - significant correlation.

### Conclusion

Based on the information presented, we can conclude that free T is the hormonal marker most closely associated with cardiovascular risk as expressed by GRACE. Furthermore, a strong association was observed between the magnitude of myocardial necrosis, as measured by troponin, and free and bioavailable T levels. These results highlight the potential importance of hormonal markers in cardiovascular risk prediction.

1. Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, et al. Age Trends in the Level of Serum Testosterone and Other Hormones in Middle-Aged Men: Longitudinal Results from the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 589–598.
2. Wu FC, Tajar A, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, et al. Hypothalamic-Pituitary-Testicular Axis Disruptions in Older Men Are Differentially Linked to Age and Modifiable Risk Factors: The European Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2737–2745.
3. Corona G, Goulis DG, Huhtaniemi I, Zitzmann M, Toppari J, Forti G, et al. European Academy of Andrology (EAA) guidelines on investigation, treatment and monitoring of functional hypogonadism in males: Endorsing organization: European Society of Endocrinology. *Andrology* 2020; 8: 970–987.
4. Nieschlag E, Behre H, Nieschlag S. Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction. (Springer-Verlag, 2010).
5. Aribas E, Kavousi M, Laven JSE, Ikram MA, Roeters van Lennep JE. Aging, Cardiovascular Risk, and SHBG Levels in Men and Women from the General Population. *J Clin Endocrinol Metab* 2021; 106: 2890–2900.
6. Wang A, Arver S, Flanagan J, Gyberg V, Näsman P, Ritsinger V, Mellbin LG. Dynamics of testosterone levels in patients with newly detected glucose abnormalities and acute myocardial infarction. *Diab Vasc Dis Res* 2018; 15: 511–518.
7. Dandona P, Dhindsa S. Update: hypogonadotropic hypogonadism in type 2 diabetes and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 2643–2651.
8. Cheung KK, Luk AO, So WY, Ma RC, Kong AP, Chow FC, Chan JC. Testosterone level in men with type 2 diabetes mellitus and related metabolic effects: A review of current evidence. *J Diabetes Investig* 2015; 6: 112–123.
9. Gencer B, Mach F. Testosterone: a hormone preventing cardiovascular disease or a therapy increasing cardiovascular events? *Eur Heart J* 2016; 37: 3569–3575.
10. Corona G, Rastrelli G, Maseroli E, Fralassi N, Sforza A, Forti G, et al. Low testosterone syndrome protects subjects with high cardiovascular risk burden from major adverse cardiovascular events. *Andrology* 2014; 2: 741–747.
11. Gencer B, Vuilleumier N, Nanchen D, Collet TH, Klingenberg R, Räber L, et al. Prognostic value of total testosterone levels in patients with acute coronary syndromes. *Eur J Prev Cardiol* 2021; 28: 235–242.
12. Fox KA, Fitzgerald G, Puymirat E, Huang W, Carruthers K, Simon T, et al. Should patients with acute coronary disease be stratified for management according to their risk? Derivation, external validation and outcomes using the updated GRACE risk score. *BMJ Open* 2014; 4: e004425.
13. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation* 2018; 138(20): e618–e651.
14. Bhasin S, Brito JP, Cunningham GR, Hayes FJ, Hodis HN, Matsumoto AM, et al. Testosterone Therapy in Men with Hypogonadism: An Endocrine Society\* Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 103: 1715–1744.
15. Bulgarian Society of Endocrinology. Recommendations for good clinical practice in gonadal diseases. Sofia, 2019. (In Bulgarian) [Българско гружество по ендокринология. Препоръки за добра клинична практика при заболявания на гонадите. София, 2019].
16. Wu FCW, Tajar A, Beynon JM, Pye SR, Silman AJ, Finn J D, et al. Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *N Eng J Med* 2010; 363 (2): 123–135.
17. Fox KA, Dabbous OH, Goldberg RJ, Pieper KS, Eagle KA, Van de Werf F, et al. Prediction of risk of death and myocardial infarction in the six months after presentation with acute coronary syndrome: prospective multinational observational study (GRACE). *BMJ* 2006; 333(7578): 1091.
18. Elbarouni B, Goodman SG, Yan RT, Welsh RC, Kornder JM, Deyoung JP, et al. Validation of the Global Registry of Acute Coronary Event (GRACE) risk score for in-hospital mortality in patients with acute coronary syndrome in Canada. *Am Heart J* 2009; 158(3): 392–399.
19. 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: 3666–3672.
20. Kelsey TW, Li LQ, Mitchell RT, Whelan A, Anderson RA, Wallace WH A Validated Age-Related Normative Model for Male Total Testosterone Shows Increasing Variance but No Decline after Age 40 Years. *PLoS One* 2014; 9: e109346.
21. Antonio L, Wu FC, O'Neill TW, Pye SR, Ahern TB, Laurent MR, Huhtaniemi IT, et al. Low Free Testosterone Is Associated with Hypogonadal Signs and Symptoms in Men with Normal Total Testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101: 2647–2657.
22. Sapin R, Schlienger JL, Gasser F, Chambron J. Changes in serum testosterone levels after myocardial infarction. *J Nucl Biol Med* 1991; 36: 20–25.
23. Hu X, Rui L, Zhu T, Xia H, Yang X, Wang X, Liu H, et al. Low testosterone level in middle-aged male patients with coronary artery disease. *Eur J Intern Med* 2011; 22: e133–e136.
24. Rosano GM, Sheiban I, Massaro R, Pagnotta P, Marazzi G, Vitale C, et al. Low testosterone levels are associated with coronary artery disease in male patients with angina. *Int J Impot Res* 2007; 19: 176–182.
25. Phillips GB, Pinkernell BH, Jing TY. The association of hypotestosteronemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 701–706.
26. Semerdjieva, N. Sex-related characteristics of acute coronary syndromes: role of steroid hormones, oxidative stress and inflammation (Medical University – Sofia, 2015) (In Bulgarian) [Семерджиева, Н. Полово обусловени характеристики на остриите коронарни синдроми: роля на стероидните хормони, оксидативния стрес и възпалението (Медицински университет – София, 2015)].
27. Handelsman, D. Androgen Physiology, Pharmacology, Use and Misuse. <https://www.endotext.org/chapter/androgen-physiology-pharmacology-use-and-misuse/> (2020).
28. Yeap BB, Marriott RJ, Antonio L, Chan YX, Raj S, Dwivedi G, et al. Serum Testosterone is Inversely and Sex Hormone-binding Globulin is Directly Associated with All-cause Mortality in Men. *J Clin Endocrinol Metab* 2021; 106: e625–e637.
29. Ramachandran S, Strange RC, Fryer AA, Saad F, Hackett GI. The association of sex hormone-binding globulin with mortality is mediated by age and testosterone in men with type 2 diabetes. *Andrology* 2018; 6: 846–853.

# Българско дружество по ендокринология *Bulgarian Society of Endocrinology*

Списание  
**ЕНДОКРИНОЛОГИЯ** ISSN 1310-8131

Journal  
**ENDOCRINOLOGIA** ISSN 1310-8131

**Адрес на редакционната колегия:**

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

**Editorial Board address for correspondence:**

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

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

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

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

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

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

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

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

#### Титулна страница

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

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

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

#### Резюме

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

#### Основен текст

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

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

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

#### Title page

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

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

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

#### Abstract

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

#### Main text

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

#### Tables and figures

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

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

## Таблицы и илюстрации

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

## Книгопис

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

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

## References

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

## Examples

### Reference to a journal article:

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

### If the original cited paper is in Bulgarian:

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

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

### Примери:

#### Статия от списание:

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

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

#### Глава (раздел) от книга:

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

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

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

### References to a book chapter:

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

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

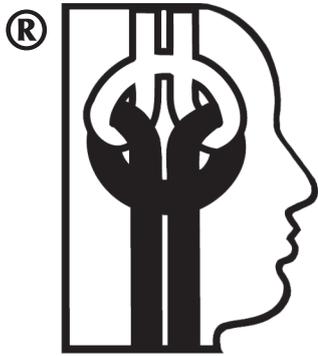
### Address for sending the manuscripts and other editorial correspondence

#### Editorial Board Address for Correspondence:

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

#### Адрес на редакционната колегия:

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



# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

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

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

**Главен редактор**

Проф. д-р Мария ОРБЕЦОВА, гм

**Редактор на английския текст**

Джеф ТОМАС

**Отговорен редактор**

Румен Нинов

© **Първа корица и графичен дизайн**

Румен НИНОВ

**Editor-in-chief**

Prof. Maria ORBETZOVA, MD PhD

**English language editor**

Jeff THOMAS

**Art director**

Rumen NINOV

© **Cover&Design**

Rumen NINOV

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

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

**Адрес на редакционната колегия:**

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

**Editorial Board address for correspondence:**

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

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

- SCOPUS Elsevier

**Bibliographic Databases  
(2001-2017)**

- EMBASE

- Bulgarian Citation Index

**(since 1996)**

- EBSCO

**(since 2019)**