

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ

КЛИНИКА ПО ЕНДОКРИНОЛОГИЯ,

УМБАЛ „АЛЕКСАНДРОВСКА“

Д-р Пламена Петрова Кабакчиева-Георгиева

**НОВИ БИОМАРКЕРИ И АНАЛИЗ НА ВРЪЗКАТА
ИМ С КЛИНИЧНИ, МЕТАБОЛИТНИ И
ХОРМОНАЛНИ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ПАЦИЕНТИ
СЪС СИНДРОМ НА ПОЛИКИСТОЗНИ ЯЙЧНИЦИ**

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

Научен ръководител: Проф. Д-р Здравко Асенов Каменов, д.м.н.

София

2022

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения.....	4
Въведение.....	7
1. Литературен обзор.....	9
1.1. Епидемиология.....	9
1.2. Диагностични критерии и фенотипни групи.....	9
1.3. Клинично представяне на СПЯ.....	11
1.4. Патофизиология.....	24
1.5. Лечение.....	51
1.6. Заключение.....	55
2. Цел и задачи.....	58
2.1. Цел.....	58
2.2. Задачи.....	58
3. Материали и методи.....	60
3.1. Пациенти и контроли.....	60
3.2. Клинични методи.....	63
3.3. Лабораторни методи.....	69
3.4. Ултразвукова диагностика.....	73
3.5. Статистически анализ.....	73
4. Резултати.....	75
4.1. Демографски, антропометрични и клинични параметри при пациенти и контроли.....	75
4.2. Анализ на демографските, антропометричните и клинични параметри във фенотипните групи на пациентите със СПЯ.....	80
4.3. Оценка на качеството на живот сред пациенти и контроли посредством модифициран въпросник за оценка на качество на живот (MPCOS-Q) при жени със СПЯ и здрави контроли.....	83
4.4. Оценка на сексуалната функция сред пациенти и контроли посредством Индекс за сексуална функция при жени (FSFI).....	87

4.5. Хиперандрогенизъм при СПЯ – изследване на връзката му с клинични и серумни маркери за ранна хрущялна загуба и с общи и свободни нива на PSA.....	91
4.6. Роля на ендоканабиноидната система в метаболитните и хормоналните нарушения при СПЯ.....	98
4.7. Изследване на цитокини, адипокини и миокини при пациенти със СПЯ и здрави контри.....	111
5. Обсъждане	125
5.1. Общ анализ по демографски, антропометрични и клинични характеристики в групите.....	126
5.2. Оценка на качество на живот в групите.....	132
5.3. Оценка на сексуалната функция в групите.....	134
5.4. Анализи във фенотипните групи на СПЯ.....	135
5.5. Хиперандрогенизъм и изследване на връзката му с клинични и серумни маркери за ранна хрущялна загуба - sCOMP, KOOS въпросник и анализ на ултразвуковите мускулно-скелетния прояви.....	137
5.6. Хиперандрогенизъм и роля на общия и свободен PSA в диагностиката му при СПЯ.....	140
5.7. Анализ на ендоканабиноидите (анандамид и 2-arachidonoyl-glycerol).....	141
5.8. Анализ на цитокини, адипокини и миокини при пациенти със СПЯ и здрави контроли.....	151
6. Изводи	164
7. Приноси	165
8. Публикации и научни съобщения по темата на дисертация.....	167
Библиография	170

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

АКТХ - адренокортикотропен хормон

АМХ - антимюлеров хормон

ГнРХ - гонадотропин-рилизинг хормон

ИР – инсулинова резистентност

ИРИ - серумен имунореактивен инсулин

ИТМ – индекс на телесна маса

ЛХ - лутеинизираща хормон

ОА - остеоартроза

ОГТТ - орален глюкозо-толерантен тест

ПГГ - плазмена глюкоза на гладно

ПКМЯ - поликистозна морфология на яйчниците

СПЯ – синдром на поликистозни яйчници

ФСХ - фоликулостимулиращ хормон

На латиница:

2-AG - 2-арахидоноилглицерол

AEA - анандамид

AE-PCOS - Androgen Excess PCOS Society

ASRM - American Society for Reproductive Medicine

BDNF - brain-derived neurotrophic factor

CB1R – канабиноиден рецептор 1

CB2R – канабиноиден рецептор 2

COMP - хрущялния олигомерен матриксен протеин

CREPCOS - The Centre for Research Excellence in Polycystic Ovary Syndrome

CRP - С-реактивен протеин

DAGL - sn-I-диацилглицерол липаза

DHEAS - dehydroepiandrosterone sulfate

ECLIA - електрохемилуминесцентен имуноанализ

EMT - ендоканабиноид-мембранни транспортери

ELISA - ензимно-свързан имуносорбентен анализ

EMA -European Medicines Agency

ESHRE - European Society for Human Reproduction and Embryology

FAAH - fatty acid amide hydrolase

FAI - free androgen index

FDA - Food and Drug Administration

FFA - свободни мастни киселини

FGF23 - fibroblast growth factor 23

GLUT4 - glucose transporter type 4

HC – обиколка на ханш

HDL - high-density lipoprotein

HOMA-IR - Homeostatic model assessment of insulin resistance

HOMA- β -cell - Homeostatic model assessment of β -cell function

ICSI - интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоид (intracytoplasmic sperm injection)

IGF-1 - инсулиноподобен растежен фактори – 1

IGFBP-1 - свързващ протеин за инсулиноподобен растежен фактори – 1

IL - интерлевкин

IVF - in-vitro fertilisation

Jak3 - Janus kinase-3

MAGL - monoacylglycerol lipase

MCP-1 - monocyte chemoattractant protein-1

Metnl - meteorin-like protein

mFG score – модифицирана скала на Ferriman-Gallwey

MPCOS-Q - modified polycystic ovary syndrome health-related quality-of-life questionnaire

mRNA - messenger RNA

NAPE - N-арахидоилфосфатидилетаноламин

NAPE-PLD - NAPE-хидролизираща фосфолипаза D

NIH - National Institutes of Health

NPY - неuropeпид Y

NT-pro-BNP - natriuretic peptide tests measure levels of BNP

PCOS-Q – polycystic ovary syndrome questionnaire

PPAR γ - peroxisome proliferator-activated receptor gamma

QUICKI - Quantitative insulin sensitivity check index

RBP-4 - ретинол-свързващ протеин 4

ROC - receiver operating characteristic

SD – стандартно отклонение

SHBG - секс-хормон свързващ глобулин

STAT3 - Signal transducer and activator of transcription 3

TNF - тумор-некрозис фактор

UCP - uncoupling protein

WAT - бяла мастна тъкан

WC – обиколка на талия

WHR – талия-ханш отношение

WHtR – талия-ръст отношение

ВЪВЕДЕНИЕ

Синдромът на поликистозни яйчници (СПЯ) е едно от най-честите ендокринни нарушения сред жените в репродуктивна възраст. Описан е за пръв път от Stein и Leventhal през 1935 година като съчетание от поликистозни яйчници, олиго-/аменорея, хирзутизъм и инфертилитет.

В последните десетилетия концепцията за СПЯ претърпя съществено развитие. Днес синдромът не се разглежда само като репродуктивно нарушение, проявяващо се клинично с хиперандрогенизъм, овулаторна дисфункция, поликистозни яйчници и инфертилитет, но и като метаболитна ендокринопатия [1]. Спрямо здравите жени, пациентите със СПЯ имат по-често затлъстяване и инсулинова резистентност [2], което увеличава неколкосткратно риска им от предиабет, захарен диабет тип 2, артериална хипертония, дислипидемия и метаболитен синдром особено в постменопаузална възраст. Тези състояния се асоциират с хронично нискостепенно възпаление [3, 4], което допълнително увеличава сърдечно-съдовия им риск.

Хроничната ановулация, ацикличната хиперестрогенемия и недостатъчната секреция на прогестерон водят до липса на секреторна трансформация на ендометриума, което повишава риска от развитие на ендометриален карцином. Жените със СПЯ имат повишен риск от ранни спонтанни аборти и усложнения на бременността като гестационен диабет, прееклампсия, еклампсия и преждевременно раждане [5]. Вероятно при тях рискът от поява на остеоартроза, венозен тромбемболизъм, сънна апнея и яйчников карцином е също повишен. Допълнително жените със СПЯ страдат по-често от депресивни разстройства [6], което влошава тяхното качество на живот и психологическо благополучие.

На фона на тази многолика и комплексна клинична картина, основните патофизиологични механизми на СПЯ остават все още недокрай изяснени. Водеща патогенетична роля се предполага, че имат хиперандрогенизмът, хиперинсулинемията и хроничното нискостепенно възпаление на мастната тъкан. От друга страна нарушенията в секрецията на гонадотропините вероятно също участват в генезата на синдрома. Изучаването на възможните патофизиологични механизми и

анализирането на взаимовръзката между тях будят научния интерес на поколения клиницисти и изследователи за изясняване на това често ендокринно нарушение сред младите жени с подчертано хетерогенно клинично представяне.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1. Епидемиология

Данните в световен мащаб сочат, че честотата на СПЯ е сходна сред жените с различна расова принадлежност. Докладваната честота в литературните източници зависи предимно от използваните за дефиниране на синдрома диагностични критерии. Според диагностичните критерии на National Institutes of Health (NIH) на САЩ от 1990 г. [7] честотата на синдрома е между 5% и 9%, докато по данни на Androgen Excess PCOS Society (AE-PCOS) от 2006 г. [8] тя е 10-15% [9]. Използвайки широко разпространените днес, одобрени и утвърдени в много страни Ротердамски критерии на European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) и American Society for Reproductive Medicine (ASRM) от 2003 г. [10], честотата на СПЯ варира от 5,5% до 19,9% [9]. Важно е да се отбележи също така, че по данни на Azziz et al. [1] и Teede et al. [11] до 70% от жените, страдащи от синдрома, остават недиагностицирани.

1.2. Диагностични критерии и фенотипни групи

Към момента съществуват три ясно дефинирани групи от критерии за диагностика на синдрома, подчертаващи различните му аспекти. Във всяка една от тях се включват трите основни компонента на СПЯ:

- (1) олигоменорея/олигоовулация/ановулация,**
- (2) клиничен и/или биохимичен хиперандрогенизъм и**
- (3) поликистозна морфология на яйчниците (ПКМЯ).**

Диагностичните критерии на NIH на САЩ изискват наличието на клиничен/биохимичен хиперандрогенизъм и олиго-ановулация за поставяне на диагнозата СПЯ, докато наличието на ехографски белези за поликистозна структура на яйчниците не е задължителна диагностична характеристика [7]. Ротердамските критерии дават еднаква тежест и на трите компонента – хиперандрогенизъм (клиничен и/или биохимичен), олиго-ановулация и поликистоза на яйчниците, като диагнозата СПЯ се поставя при наличие на поне два от изброените три

характеристики [10]. Към момента Ротердамските критерии са възприети и от NIH за диагностични критерии и са широко използвани в практиката за поставяне на диагнозата СПЯ.

Препоръките на AE-PCOS Society поставят фокус на първо място върху хиперандрогенизма, който е задължителен диагностичен компонент. Наличието на една от следните две характеристики: олиго-ановулация или ехографски данни за поликистозна структура на яйчниците, допълва диагнозата СПЯ [8]. Важно е да се уточни, че във всяка от трите дефиниции се изисква отхвърлянето на други ендокринни нарушения като: хиперпролактинемия, тиреоидна дисфункция, преждевременна овариална недостатъчност, хипоталамична аменорея, вродена надбъбречно-корова хиперплазия, адроген-продуциращи тумори, синдром или болест на Кушинг, влияние на медикаменти и др. [12].

Наличието или отсъствието на една от трите диагностични характеристики оформят четири фенотипни групи (**фигура 1.1**).

Фенотип А и В се определят още като класически фенотипове. Фенотип А е представен и с трите диагностични компонента (хиперандрогенизъм, олиго-ановулация и ПКМЯ), което го превръща в т. нар. „завършена“ форма, докато при фенотип В отсъства ПКМЯ. Обичайно клиничната манифестация и при двата фенотипа е най-богато представена, метаболитните прояви и инсулиновата резистентност са най-изразени. С по-лека клинична картина по отношение на метаболитните прояви се характеризира т.нар. овулаторен СПЯ фенотип, презентиращ се само с хиперандрогенизъм и ПКМЯ (фенотип С). При този фенотип рискът от хиперстимулационен овариален синдром е по-висок, а метаболитните прояви са по-умерено представени.

1990 NIH САЩ критерии

2006 АЕ-PCOS критерии

2003 Ротердамски критерии

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

Фигура 1.1. Фенотипни групи

Най-лека клинична манифестация по отношение на инсулиновата резистентност и метаболитните прояви се наблюдава при т. нар. нехиперандрогенен СПЯ фенотип, при който хиперандрогенизъмът отсъства (фенотип D) (фигура 1.2). Подобна зависимост са докладвали Пехливанов и Орбецова в резултат на клинично изследване, проведено сред 70 жени със СПЯ, разпределени в 4 фенотипни групи. Данните сочат, че сред жените с фенотип А и В затлъстяването, инсулиновата резистентност и хиперандрогенизъмът са били сигнификантно по-изразени спрямо сред другите два фенотипа (С и D) [13].

1.3. Клинично представяне на СПЯ

СПЯ е клиничен синдром, съчетаващ признаците и симптомите на трите основни диагностични характеристики – хиперандрогенизъм, овулаторна дисфункция и ПКМЯ.

1.3.1. Хиперандрогенизъм

В две от изброените дефиниции на синдрома хиперандрогенизъм е задължителен диагностичен компонент като предполагаем водещ патогенетичен фактор на заболяването. Наличието му се потвърждава при присъствие на клинични белези за хиперандрогенизъм (клиничен хиперандрогенизъм) – хирзутизъм, акне или алопеция, и/или лабораторни данни за повишени нива на андрогените (хиперандрогенемия или биохимичен хиперандрогенизъм).



Фигура 1.2. Илюстрация на клиничното представяне на СПЯ фенотиповете: Класически СПЯ фенотип (фенотип А и В) съчетаващ хиперандрогенизъм (хирзутизъм, акне, алопеция), олиго-ановулация (менструални нарушения, инфертилитет, ендометриална хиперплазия) с/без поликистозна морфология на яйчниците (ПКМЯ) с най-тежка клинична манифестация на метаболитните прояви, отбелязани с (+++). Овулаторен СПЯ фенотип (фенотип С), презентиращ се хиперандрогенизъм и ПКМЯ и по-лека степен на клинично представяне на метаболитните прояви, отбелязани с (++). Нехиперандрогенен СПЯ фенотип (фенотип D) съчетаващ олиго-ановулация и ПКМЯ и най-леко представяне на метаболитните прояви, отбелязани с (+/-). Адаптация по [14]

➤ *Клиничен хиперандрогенизъм*

Хирзутизъм. Хирзутизмът, акнето и андрогенната алопеция са клиничните признаци и симптоми на хиперандрогенизма, от които хирзутизмът е най-честият [15]. Той се дефинира като поява на ексцесивно окосмяване (дълги > 5 мм, пигментирани, задебелени косми, наричани още терминални косми) в андроген-зависимите зони при жената. Те се различават от т.нар. велусни косми, които са тънки, меки, непигментирани и са предимно в зони, чийто растеж не се контролира от андрогените.

Обикновено появата на хирзутизма настъпва след менархе. Развива се постепенно и интензитетът му се увеличава с покачването на телесното тегло, докато при неопластичните вирилизирани тумори е налице бърза изява на тежък хирзутизъм, нерядко асоцииращ се с клиторомегалия и олигоменорея [16].

Клинична оценка на степента на хирзутизма се извършва посредством модифицираната скала на Ferriman-Gallwey (mFG score) [17-19], която оценява степента на окосмяване в 9 андроген-зависими зони на тялото (горна устна, брадичка и шия, гърди [с изключение на зърната], горна и долна част на гърба, горна и долна част на корема [над и под пъпа], мишница, вътрешната страна на бедрата) по скала от 1 (минимално наличие на терминални косми) до 4 (наличие на терминални косми, подобни на тези при добре окосмен мъж). Липсата на терминални косми в изследваната област се отбелязва с 0. Наличие на хирзутизъм се приема при наличие на общ брой точки $\geq 4-6$ [11].

Акне. Акнето е възпалително състояние на космения фоликул и прилежащите мастна и апокринни жлези (пило-себацейна единица). Характеризира се с повишено производство на себум, нарушена диференциация на фоликуларния епител, повишена кератинизация, водеща до запушване на пило-себацейната единица от десквамирани епителни клетки, растеж и развитие на микроби (напр. *Propionibacterium acnes*) и като краен ефект поява на локално възпаление.

Акне се среща в 15-25% от жените със синдрома, като тази честота варира според етническата принадлежност [20]. Предвид фактът, че е често срещан

дерматологичен проблем сред подрастващите, акнето не се препоръчва да се използва за диагностичен белег на хиперандрогенизма в тази възраст [21]. Акне, персистиращо след пубертета или новопоявило се след 20-30 годишна възраст, би могло да се приеме за клиничен белег на хиперандрогенизма [16].

Алопеция. Нормалният космен цикъл включва три фази – на растеж (анагенна), преходна (катагенна) и фаза на покой (телогенна), при която старите космени фоликули са вече напълно подготвени за отпадане и замяна с нови. При андрогенна свръхекспозиция се наблюдава скъсяване на анагенната фаза, имащо за резултат намаляване на окосмяването по капилициума, отпадането му и изява на алопеция. При жените тя се проявява с дифузно оплешивяване предимно по срединна линия (центро-париеталната зона) и по-малко във фронталната област. В случаите на тежък хиперандрогенизъм може да се наблюдава битемпорално и фронтално оплешивяване [22]. Обобщено алопецията е рядък признак на функционален хиперандрогенизъм, какъвто се наблюдавана при СПЯ.

➤ *Биохимичен хиперандрогенизъм*

Измерването на общия плазмен тестостерон в ранните сутрешни часове е скринингов тест за доказване на хиперандрогенемия при пациентки с хирзутизъм [20]. В 33-50% от жените с хирзутизъм обаче може да се установят нормални нива на тестостерона [23]. Причина за това е фактът, че нивата на общия тестостерон се влияят от нивата на секс-хормон свързващ глобулин (SHBG). 65% от тестостерона е свързан със SHBG, 1-2% от него е свободна фракция (несвързан с белтъци), а останалата част е свързана с албумин. Следователно при жените с ниски нива на SHBG може да се установят нормални нива на общ тестостерон и това да бъде причина за пропускане на реално съществуваща хиперандрогенемия [12]. Съвременните препоръки днес обръщат поглед към измерването на свободната фракция на тестостерона, определянето на биоактивен тестостерон и free androgen index (FAI) и отчитат тези показатели като по-чувствителни маркери за установяване на андрогенен ексцес, отколкото общия тестостерон [11]. Свободният тестостерон може да се измерва директно посредством равновесни диализи или да се изчислява чрез математически формули, като двата метода са с добра конкордантност [24]. В

диагностиката на биохимичния хиперандрогенизъм често се използва и FAI. Неговото изчисляване зависи от точното измерване на общия тестостерон и SHBG: $FAI = \text{тестостерон (nmol/L)} / \text{SHBG (nmol/L)} \times 100$, като нива на $FAI \geq 5$ потвърждават наличието на биохимичен хиперандрогенизъм [25].

Определянето на нивата на дехидроепиандростерон сулфат (DHEAS) и андростендион носят допълнителна диагностична стойност в случаите на нормален общ и/или свободен тестостерон [11].

➤ ***Роля на простат-специфичен антиген (PSA) в диагностиката на хиперандрогенизма***

PSA е добре познат серумен маркер при мъжете, като чувствителен показател в диагностиката на простатния карцином [26], но също и като корелиращ маркер с циркулиращите андрогени [27]. В миналото се е смятало, че PSA е специфичен показател за мъжете, който не би могъл да бъде изолиран в женския организъм, тъй като се отделя от простатата. Изследвания доказват, че PSA се изолира от много тъкани при жените, включващи млечни жлези, периуретрално, овариална, ендометриална, слюнчена и тиреоидна тъкан, амниотична течност, кърма, серум, включително и от много тумори [28-30]. Генната експресия за PSA се увеличава под въздействие на андрогените и прогестините в млечните жлези и други тъкани при жената, както и при експериментално създадени модели на клетъчни линии за карцином на млечната жлеза [31-34]. Естрогените влияят върху PSA регулацията по-скоро индиректно, чрез повлияване на андроген-индуцираната PSA синтеза [30].

Сред жени с хирзутизъм и жени със СПЯ има данни, че PSA е повишен [35-37]. В проучване, изследващо уринните нива на PSA сред жени със СПЯ, е докладвано, че нивата им са били почти 200-пъти по-високи спрямо здравите контроли [35]. Съществува изследване сред транссексуални жени, при които след назначаването на тестостероново лечение е демонстрирано увеличение на серумните и уринните нива на PSA. Това проучване демонстрира, че андрогените регулират PSA-синтезата в женските тъкани *in vivo* [38, 39].

PSA циркулира в кръвта свързан с протеазния инхибитор алфа-антихимотрипсин (complexed PSA, (cPSA)), който е около 80% от тоталния PSA

(tPSA), както и в свободна форма, която е ензимно активната форма (free PSA (fPSA)) – 20% от тоталния PSA [40, 41].

В проучване, изследващо нива на tPSA и fPSA сред здрави жени и жени със СПЯ, се установява 3-пъти по-високи нива на маркерите сред жените със СПЯ. Налице е и сигнификантна корелация между двата показателя с нивата на свободния и общия тестостерон сред жените със СПЯ и здравите контроли [42].

От натрупаните данни до момента става ясно, че PSA не е само специфичен простатен маркер, но и протеин, който се синтезира под въздействие на стероидните хормони в клетките, притежаващи рецептори за тях. Предполага се, че PSA може да играе ролята на растежен фактор в нормални тъкани, при бременност и тумори [30]. Допълнително се счита, че tPSA и fPSA могат да бъдат както поотделно, така и в комбинация полезни серумни биомаркери в диагностиката на хиперандрогенизма при СПЯ [42].

1.3.2. Овулаторна дисфункция

Менструалните нарушения при СПЯ се дължат на дисбаланса между инхибиращия ефект на андрогените, стимулиращия ефект на инсулина и ацикличната хиперестрогенемия върху ендометриума [43]. По-често те са по типа на олиго-/аменорея, но би могло да се наблюдават и дисфункционални маточни кръвотечения, вследствие на хиперестрогенемията. В диагностичните критерии на синдрома се включва наличието на олиго-/ановулация. Нередовният менструален цикъл, протичащ с олигоменорея или аменорея, предполага с голяма вероятност, че той не е овулаторен и по-нататъшни тестове за доказването му не са необходими. Според Международните препоръки за оценка и лечение на СПЯ на The Centre for Research Excellence in Polycystic Ovary Syndrome (CREPCOS), разработен в колаборация с ESHRE и ASRM от 2018 г. нередовният менструален цикъл се дефинира като [11]:

- менструален цикъл < 21 дни или > 45 дни в периода между 1 и 3 години след менархе;
- менструален цикъл < 21 дни или > 35 дни, или < 8 менструални цикъла годишно в периода от 3 години след менархе до менопаузата;

- менструален цикъл > 90 дни при момичета до 1 година след настъпване на менархе;
- първична аменорея на 15 годишна възраст или 3 години след настъпило телархе.

Менструален цикъл, който е леко удължен (между 32 и 35-36 дни), изисква допълнително уточняване наличието на овулация [20]. Овулаторна дисфункция може да е налице и при жени с редовен менструален цикъл. Затова при суспектна ановулация е необходимо да се измерят прогестеронови нива в лутеална фаза (19-22 ден) на менструалния цикъл [11].

1.3.3. Поликистозна морфология на яйчниците

Поликистозният яйчник се характеризира с уголемени размери, съдържание на два пъти повече растящи фоликули и повишен обем на стромата [23]. Според Ротердамските критерии, поликистозна морфология на яйчниците е налице при ултразвукови данни за наличие на поне 12 фоликула с размер между 2-9 мм в целия яйчник и/или при наличие на повишен яйчников обем ≥ 10 мл. Достатъчно е изменението да засягат само единия яйчник [10]. С оглед навлизането на по-нови ултразвукови технологии и повишената диагностична стойност на изследването, днес препоръките за брой на овариалните фоликули се измениха на 25 фоликула [8], а според други ръководства на > 20 фоликула в единия яйчник при ехографски данни за липса на corpora lutea, кисти или доминантни фоликули в него [11].

В последните препоръки се обсъжда ролята на анти-мюлеровия хормон (AMH) като надежден маркер, чиито повишени нива корелират добре с наличието на поликистозна морфология на яйчниците [11, 44]. Бъдещи научни изследвания ще покажат дали AMH ще се утвърди като показател, който достойно може да замести ехографското изследване.

1.3.4. СПЯ - асоциирани нарушения и коморбидитети

➤ Затлъстяване, метаболитни нарушения и сърдечно-съдов риск

Макар затлъстяването да не се включва в диагностичните критерии на СПЯ, налице е строга връзка между двете състояния [45]. Все още причината не е напълно ясна, но данните сочат, че обезитет се установява при около 30% от жените със СПЯ, а според други изследователи честотата може да достига до 75% [9, 46-48]. В най-голямото ретроспективно проучване в България, Гатева и Каменов демонстрират, че затлъстяването е най-важният фактор за развитие на метаболитен синдром и оформящия се в резултат на това сърдечно-съдов рисков профил при жените със синдрома [45].

Жените със СПЯ имат по-често инсулиновата резистентност (ИР) спрямо здравите жени със същия индекс на телесна маса (ИТМ) без СПЯ [49]. Въпреки наблюдаваната хиперинсулинемия в отговор на ИР, част от жените със СПЯ не успяват да отговорят с адекватно покачващи се нива на инсулина, което предполага допълнително наличие на бета-клетъчна дисфункция [50]. Това обяснява повишения риск от предиабет и захарен диабет тип 2 при тях, отчетен че е 5 до 7 пъти по-висок спрямо този при здравите контроли на същата възраст [51]. Въглехидратните нарушения се асоциират допълнително с хронично нискостепенно възпаление [3, 4], което от своя страна увеличава и сърдечно-съдовия им риск. Честотата на неалкохолната стеатозна чернодробна болест сред тях е по-висока. Те имат също така около 2 пъти по-висок риск за развитие на метаболитен синдром спрямо здравите жени със същия ИТМ и възраст [51], който сам по себе си е водещ рисков фактор за сърдечно-съдови заболявания.

В своя дисертационен труд Гатева изследва за пръв път в България сърдечно-съдовия риск сред жени със СПЯ, като за целта анализира няколко нови сърдечно-съдови рискови фактора – NT-pro-BNP, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), миелопероксидаза, фетуин А, пероксиредоксин 4 и витамин Д [52]. Въпреки че не е установена сигнификантна разлика в нивата на NT-pro-BNP [53], MCP-1, фетуин А [54] и пероксиредоксин 4 [55] в трите изследвани групи (жени със СПЯ със/без затлъстяване и жени само със затлъстяване), се установява ясна връзка между

затлъстяването и метаболитния синдром при СПЯ, които доказано повишават сърдечно-съдовия риск. В друго изследване Гатева и съавтори доказват връзка между повишените нива на fibroblast growth factor 23 (FGF23) и ниските нива на 25-ОН-витамин Д с абдоминалното затлъстяване и сърдечно-съдовия риск сред жените със СПЯ [56]. Делът на жените със СПЯ и витамин-Д дефицит/недостатъчност е бил близо 2/3 от изследваните общо 103 жени (разделени в три групи – затлъстяване без СПЯ и СПЯ със/без затлъстяване) в проучване на Цакова и съавтори. Данните от това проучване още сочат, че висцералният тип затлъстяване, независимо от СПЯ-статуса, се свързва със сигнификантно по-ниски нива на 25-ОН-витамин Д спрямо слабите жени със синдрома [57].

Жените със СПЯ и затлъстяване се счита също, че имат повишен риск от изява на обструктивна сънна апнея [58, 59]. Полисомнографско изследване, проведено сред българска популация (30 жени – 11 със затлъстяване, 13 СПЯ без затлъстяване и 6 СПЯ със затлъстяване) показва, че водеща роля за появата на сънна апнея имат възрастта и затлъстяването, а не толкова диагнозата СПЯ [60].

Типът на преразпределение на мастната тъкан има важно значение за изявата на наблюдаваните метаболитни нарушения при СПЯ. Централният (андроиден) тип затлъстяване при жените със синдрома е по-често свързан с хормонални нарушения, менструални смущения и инфертилитет [61], спрямо периферният (гиноиден) тип разпределение на мазнините. Жените със СПЯ са предимно с андроиден тип на разпределение на мастната тъкан, като подобна зависимост се наблюдава не само сред СПЯ-жените със затлъстяване, но и при тези от тях с наднормено или нормално телесно тегло [62]. Спрямо жените с периферен тип затлъстяване, сред андронидните-СПЯ се установяват по-ниски нива на SHBG [63], по-високи на тестостерон и дихидротестостерон [64], независимо от ИТМ [65]. Тези факти подчертават необходимостта от използване в клиничната практика на точни и надеждни индекси за оценка на висцерален тип затлъстяване. ИТМ е недостатъчно информативен показател за диференциация между мускулната маса и телесните мазнини [66]. Съотношението талия/ханш (waist-to-hip ratio, WHR) е един от най-често използваните антропометрични параметри за оценка на централно затлъстяване и за

разлика от ИТМ напоследък се съобщава, че добре корелира със смъртността [67]. Изследване на Гатева и Каменов показват, че съотношението талия-височина (waist-to-height ratio, WHtR) и обиколката на талията (waist circumference, WC) са подходящи показатели при оценка на сърдечно-съдовия риск и ИР сред пациентите с СПЯ, за разлика от WHR [68, 69].

➤ ***Репродуктивни и гинекологични нарушения***

СПЯ е причина за репродуктивни нарушения при около 80% от жените с ановулаторен инфертилитет [70]. Въпреки че няма данни за повишен риск от спонтанни аборти и загуба на плода в ранна бременност, при СПЯ е по-висок рискът от акушеро-гинекологични усложнения като прееклампсия, еклампсия, гестационен диабет, макрозомия на плода [51, 71].

Допълнително хроничната ановулация, ацикличната хиперестрогенемия и недостатъчната секреция на прогестерон водят до липса на секреторна трансформация на ендометриума, което повишава риска от хиперплазия на ендометриума и развитие на карцином на ендометриума [51]. Данните сочат, че жените със СПЯ имат 2,7 по-висок риск от карцином на ендометриума [72]. Затова при жените с анамнеза за продължителна, нетретирана олиго-аменорея и/или ехографски данни за увеличена дебелина на ендометриума се препоръчва провеждането на биопсия на ендометриума [72]. Предполага се, че жените със СПЯ имат също повишен риск от поява на карцином на яйчниците, но няма данни за подобен риск по отношение на карцинома на гърдата [51].

➤ ***Качество на живот и психологическо благополучие***

Доказано жените със СПЯ имат повишена тревожност и по-изразена склонност към депресии [73]. Водещи фактори, влияещи за появата на тези психологически разстройства сред тях, се счита, че имат хирзутизмът, акнето, затлъстяването и инфертилитета [74-77]. Допълнително хроничният ход на протичане [78-80], комплексната и хетерогенна природа на СПЯ [81, 82] влияят също негативно върху психологическото благополучие на жените със синдрома. Макар да има разнопосочни данни за това дали жените със СПЯ страдат от хранителни заболявания

(anorexia nervosa или bulimia nervosa) [83, 84], по-често при тях се установяват някои от рисковите фактори (затлъстяване, депресия, повишена тревожност, влошено самочуствие и себеуещане) за изява на хранителни заболявания или друг вид нарушения в храненето като т.нар. „bing-eating“, „прочиствания“, гладувания или спазването на друг тип рестриктивни диети [85-88]. Допълнително, сред жените със СПЯ се установяват по-често сексуални смущения, нарушения в съня, влошено качеството на живот и най-общо влошено психологическо благополучие [51, 89, 90]. Затова в съвременните препоръки е заложено провеждането на оценка на качеството на живот изходно и в хода на лечение сред всички жени със СПЯ [11], посредством общи или специализирани въпросници за оценка на качество на живот като PCOS questionnaire (PCOSQ) или модифицираната му версия - modified polycystic ovary syndrome health-related quality-of-life questionnaire (MPCOS-Q) [6, 91].

➤ *Връзка между СПЯ и хрущялната загуба*

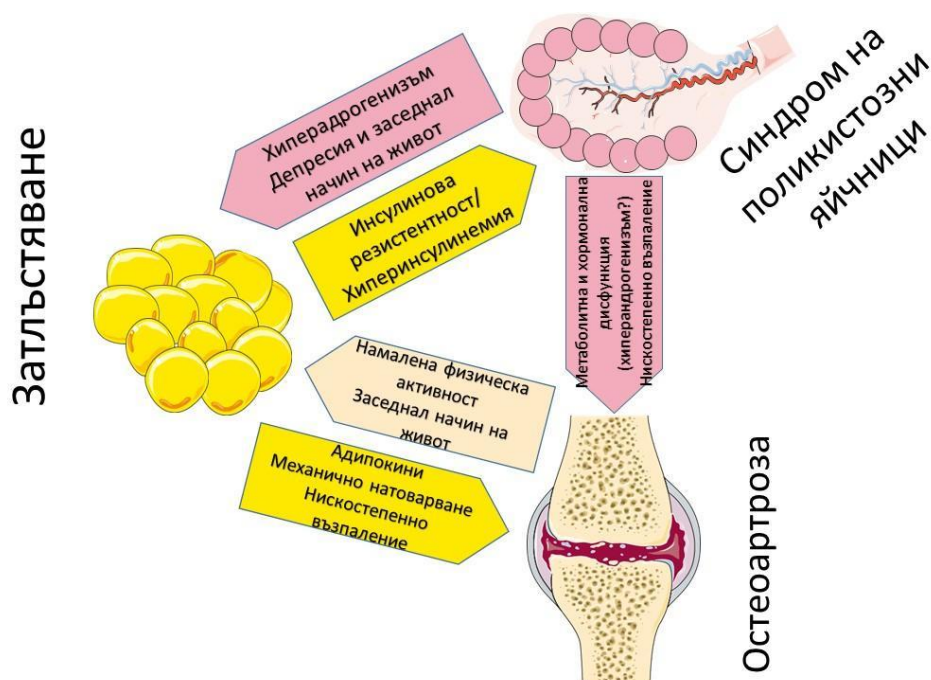
Обсервационни и интервенционални проучвания показват, че хрущялната загуба при жени зависи от хормоналния статус [92-96]. Данните се потвърждават с резултати от клиничната практика показващи, че при 64% от жените с дегенеративна ставна болест, ангажираща коленните стави, симптомите започват през първите 5 години след настъпване на менопауза [97]. Допълнително е докладвана корелация между ниските нива на естрогените и радиографски установената намалена ставна междина на коленните стави (индиректен белег за хрущялна загуба) при постменопаузални жени [98]. На базата на тези данни някои автори въвеждат понятието „хормонозависима“ остеоартроза (ОА) [99].

В последните години концепцията за ОА претърпя развитие. От ставна болест, характеризираща се с механично износване на колянната става, днес ОА се разглежда като заболяване, придружаващо се от инфламаторна компонента [100], хормонален и метаболитен дисбаланс [101, 102], при което се засягат освен ставата и околните тъкани, и функционалното единство на организма като цяло. Това дава основание да се препоръчва мултимодален терапевтичен подход на лечение, насочен към различни ставни елементи [103], стартиран в най-ранен предклиничен и предрадиографски

стадий на заболяването с цел постигане на по-пълно, ефективно и навременно лечение на ОА.

Анализът на връзката между хиперандрогенизма и метаболитните промени при СПЯ от една страна и дегенерацията на ставния хрущял при жени от друга, остава все още малко проучена област в научната литература. През последните години все по-често ОА се възприема като първично метаболитно нарушение, при което липидни, метаболитни и хуморални фактори допринасят за нейното начало и прогресия [104]. Известно е, че СПЯ и ОА притежават някои общи характеристики. И двете състояния се асоциират със затлъстяване, повишен сърдечно-съдов риск и метаболитен синдром. Друг общ момент при двете състояния е, че ОА, подобно на СПЯ, може да се разглежда като силно хетерогенно състояние с различна етиология, резултат от комбинация на системни (генетични, хормонални и метаболитни) и локални фактори. Скорошен многокомпонентен комплексен анализ на взаимодействията между белтъчни молекули разкрива асоциация между двете заболявания [105] (**Фигура 1.3**).

От изложеното дотук възниква въпросът, възможно ли е СПЯ като едно често ендокринно-метаболитно нарушение, характеризиращо се както с хормонален дисбаланс, така и с метаболитни нарушения, да бъде независим фактор за хрущялна загуба в млада възраст (преостеартроза) и по този начин да увеличава риска от настъпване на хрущялна увреда на по-късна възраст? И докато се знае, че естрогените играят протективна роля върху ставния хрущял, в литературата се намират малко данни относно ролята на андрогените върху ставния хрущял при жените. При мъжете е известно, че те имат протективна роля [106]. Оттук логичен е въпросът, хиперандрогенизмът при жените със СПЯ има ли също протективна роля или има по-скоро неутрална/негативна роля върху ставната микросреда?



Фигура 1.3. Предполагаеми механизми на взаимовръзка между затлъстяването, синдрома на поликистозни яйчници и остеоартрозата Затлъстяването и в частност висцералната мастна тъкан силно влияят върху развитието на инсулинова резистентност и хиперинсулинизъм. Те са добре познати ключови фактори в патогенезата на СПЯ. От друга страна хиперандрогенизмът независимо увеличава риска от андройден тип затлъстяване. Допълнително влияние имат депресията и заседналият начин на живот. Както при СПЯ, така и при ОА те имат определящ фактор за увеличаване на затлъстяването. Секретираните от висцералната мастна тъкан адипокини и други фактори на нискостепенно възпаление, оказват директен и индиректен ефект върху ставния хрущял. Хипоестрогенемията се асоциира с повишена загуба на ставен хрущял и намален праг на болка.

Жените със СПЯ страдат по-често от гон- и коксартроза, показва проучване на популационно ниво [107]. От друга страна жените със СПЯ имат по-дебел феморален хрущял в сравнение с контролна група [108], което може би се дължи на андрогенния излишък. Това поставя на преден план още веднъж въпроса за ролята на хиперандрогенизма при жените и ролята му като евентуален протективен фактор за развитие на остеоартроза. Определянето на моментната хрущялна загуба, измерена чрез чувствителни серумни биомаркери като хрущялния олигомерен матриксен протеин (COMP), несъмнено би могло да хвърли светлина върху този въпрос.

COMP е тъканно-специфичен матриксен протеин, част от тромбоспондиновата фамилия. Той се синтезира главно от хондроцитите, като големи

количества от него могат да се открият в хиалинния хрущял. Макар, че концентрацията на СОМР в синовиалната течност е 10 пъти по-висока от тази в серума [109], ролята му в патогенезата на ОА е все още недостатъчно проучена. Потвърдено е, че серумните нива на СОМР корелират позитивно с образните промени, оценени посредством ядрено-магнитен резонанс на колянната става [110]. Допълнително серумните нива на маркера могат да помогнат за отдиференцирането на здрави от пациенти с артроза, като нивата му добре корелират със степента на болестна активност [111-113], или да се използват с прогностична цел на заболяването [114].

Доколкото е известно, понастоящем не съществуват изследвания, анализиращи нива на СОМР сред жени със СПЯ. Като един относително специфичен за хиалинния хрущял маркер, СОМР е идеалната молекула за изследване с цел установяване на предрадиографска повишена загуба на хрущял в резултат на повишен катаболизъм сред жени със СПЯ.

1.4. Патопатология

1.4.1. Инсулинова резистентност и хиперинсулинемия

Молекулните механизми, които водят до ИР при СПЯ, са различни от тези при другите инсулин-резистентни състояния като затлъстяването и захарния диабет тип 2. Тя е селективна – засегнати са метаболитните ефекти на инсулина, докато митогенните му не са, което обяснява парадокса в персистиращите репродуктивни ефекти на инсулина на фона на системна ИР [1]. Инсулинът стимулира овариалната андрогенна продукция по няколко механизма:

1. директно - посредством овариалните инсулинови рецептори;
2. индиректно - посредством овариалните рецептори за инсулиноподобен растежен фактор – 1 (IGF-1);
3. понижавайки нивата на свързващия протеин за IGF-1 (IGFBP-1);
4. амплифицирайки медираната от лутеинизиращия хормон (ЛХ) секреция на андрогени;
5. повишавайки експресията на ЛХ и IGF-1 рецептори;

6. стимулирайки тека-клетъчна пролиферация;
7. понижавайки нивата на SHBG, с което се увеличават индиректно нивата на биологично активния тестостерон;
8. увеличавайки адренкортикотропен хормон (АКТХ)-медираната адренална андрогенна продукция [49, 115-120].

В контекста на тези данни следва да се отбележи също, че ИР участва критично в развитието на метаболитен синдром и сърдечно-съдови заболявания при жените със СПЯ, поради което се счита, че повлияването ѝ, посредством промени в начина на живот, употреба на сенсibiliзиращи инсулина лекарства или бариатрична хирургия, е важно както за намаляване на ИР, така и за облекчаване на последиците от нея [121-123].

Съгласно актуалния консенсус за диагностика и лечение на СПЯ, оценка на въглехидратната обмяна и наличието на ИР/хиперинсулинемия е препоръчително да се извършва при всички новодиагностициращи се жени със синдрома [11].

Разработени са няколко теста за количествено определяне на ИР. Някои от тези тестове са надеждни, но по-трудоемки за изпълнение, докато други са по-малко точни, но по-лесно приложими в клиничната практика поради по-малката инвазивност и по-лесния алгоритъм за изпълнение. Хиперинсулинемичната еугликемична кламп-техника е златен стандарт за директно определяне на инсулинова чувствителност, но е продължително, трудоемко, скъпо и технически взискателно изследване [124].

Хомеостатичният модел за оценка (Homeostatic Model Assessment, НОМА) използва нивата на кръвната захар и инсулина на гладно за определяне на ИР (НОМА-IR) и бета-клетъчната функция (НОМА-β-cell) чрез две математически формули [125]. В идеалния вариант млад индивид на възраст под 35 години и с нормално телесно тегло би имал НОМА-IR = 1 и НОМА-β-cell = 100% [126].

$$\text{НОМА-IR} = (\text{инсулин на гладно (mU/ml)} \times \text{глюкоза на гладно (mmol/l)}) / 22,5$$

и

$$\text{НОМА-}\beta\text{-cell} = (20 \times \text{инсулин на гладно (mU/ml)}) / (\text{глюкоза на гладно (mmol/l)} - 3,5)$$

Количественият индекс за оценка на инсулиновата чувствителност (Quantitative insulin sensitivity check index, QUICKI) е друг инструмент за определяне на инсулиновата чувствителност използващ отново нивата на кръвната захар и инсулина на гладно [127, 128]. Той е лесно изпълним, минимално инвазивен и евтин метод, който намира широко приложение в клиничните изследвания. Представлява стабилен и точен индекс, отразяващ инсулиновата чувствителност с положителна прогностична сила, корелиращ добре с инсулиновата чувствителност, оценена чрез еугликемична кламп техника. При жени със СПЯ обаче данните показват, че, подобно на НОМА, QUICKI не корелира в добра степен с кламп техниката, която остава златен стандарт в оценката на инсулиновата чувствителност [129].

$$\text{QUICKI} = 1/[\log (\text{Инсулин в } \mu\text{IU/mL}) + \log (\text{Глюкоза в mg/dL})]$$

Оралният глюкозо-толерантен тест (ОГТТ) е лесно изпълнимо изследване, широко използвано в медицинската практика за диагностициране на предиабет и захарен диабет, включително и сред пациентите със СПЯ [130]. След прием на 75 g глюкоза, концентрациите на глюкозата и инсулина в кръвта се измерват на 0, 60 и 120 минути. ОГТТ предоставя важна информация за глюкозния толеранс, но също така чрез измерване на инсулиновите нива дава допълнително информация за степента на хиперинсулинемията и качествена оценка за степента на ИР. Пикови инсулинови нива в хода на ОГТТ между 100-150 $\mu\text{IU/mL}$ са индикативни за лека ИР/хиперинсулинемия, нива на инсулина между 150-300 $\mu\text{IU/mL}$ - за умерена ИР/хиперинсулинемия и нива над 300 $\mu\text{IU/mL}$ - за тежка ИР/хиперинсулинемия [126].

Допълнителни критерии за обективизиране на ИР при СПЯ могат да бъдат повишените инсулинови нива на гладно или пониженото съотношение глюкоза/инсулин на гладно (под 6 при глюкоза в mg/dL или под 0.333 при глюкоза в mmol/L). В проучване Орбецова, Каменов и съавтори [131] демонстрират сред 94 жени със СПЯ, че стойностите на глюкозата на втория час в хода на ОГТТ насочват към нарушен глюкозен толеранс (7,4%) и диабет (1,1%) или общо при 8,5% от жените със СПЯ, докато нивата ѝ на гладно демонстрират нарушения само при 2,2% от тях. За разлика от гликемията нивата на базалния инсулин остават в границите на нормата при по-голямата част от пациентите и не са предиктивни за реакцията на инсулина в

хода на обременяването с глюкоза. С нарастването на телесното тегло обаче растат и нивата на инсулина на гладно. При над 2/3 от изследваните жени със СПЯ, включително и тези без затлъстяване, се наблюдава намалено съотношение глюкоза/инсулин, повишен НОМА-IR и свръхстимулация на инсулина. Въз основа на тези резултати авторите на изследването заключват, че и трите критерия (намалено съотношение глюкоза/инсулин, повишен НОМА-IR и свръхстимулация на инсулина в хода на ОГТТ) са съпоставими и биха могли да се използват за диагностика на ИР.

Въпреки това препоръките са инсулинемията на гладно да се използва по-скоро за качествена оценка, а не за количествена оценка на ИР/хиперинсулинемията. Съотношението глюкоза/инсулин не се препоръчва да се използва с диагностична цел, защото стойностите му могат да варират в широки граници и не е валидиран метод при пациенти без затлъстяване. За разлика от тях НОМА индексите, QUICKI и инсулинемията в хода на ОГТТ корелират задоволително добре с резултатите от златния стандарт и същевременно са по-лесни за изпълнение, което ги прави подходящи методи в диагностиката на ИР при СПЯ [126].

1.4.2. Роля на затлъстяването и висцералната мастна тъкан

Висцералната мастна тъкан е депо за различни мастноразтворими стероиди, включително и андрогени, в което протича интензивен метаболизъм на половите хормони. През последните десетилетия, изследванията в областта на затлъстяването постигнаха огромен напредък с откритието, че мастната тъкан, особено бялата мастна тъкан (WAT), действа като ендокринен орган и посредством различни сигнални молекули модулира метаболизма на другите органи [132]. Адипоцитите секретират много хормони и различни цитокини (адипокини) [133], които играят роля в нарушеното действие и секреция на инсулин и съответно водят до инсулинова резистентност, ендотелна дисфункция и атеросклероза [134], с което също така поддържат хронично нискостепенно възпаление.

Асоциацията между СПЯ и нискостепенно възпаление се потвърждава във все повече изследвания, установяващи повишени нива на различни възпалителни маркери, като С-реактивен протеин (CRP) [135, 136], интерлевкин-6 [137], интерлевкин-18 [138-140], monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) [141-143],

както и наличието на ендотелна дисфункция [144, 145] и повишен оксидативен стрес [146]. Независимо от това възпалителният характер на СПЯ все още остава спорен въпрос поради голямата вариабилност в публикуваните резултати от проучвания в областта. Следователно все още няма достатъчно доказателства за това окончателно да се утвърди една подобна взаимовръзка [136, 147]. Според Duleba и Dokras независимата връзка между СПЯ и нискостепенното възпаление не е съвсем сигурна и може да бъде анализирана само след ясна стратификация на участниците в клиничните проучвания според ИТМ и други параметри с ясно дефинирани и клинично значими гранични нива [147].

Терминът адипокин описва всички протеини, секретирани от адипоцитите, които играят роля в енергийната хомеостаза и имунитет. Потвърдено е, че част от адипокините влияят пряко или косвено, както върху инсулиновата чувствителност и глюкозния метаболизъм, така и върху липидната обмяна [132]. Броят на изследваните адипокини непрекъснато расте, като сред по-проучените и познати адипокини при СПЯ се нареждат: лептин, адипонектин, резистин, оментин, висфатин, апелин, ретинол-свързващ протеин 4 (RBP 4), грелин [148-151]. В опит да се разгърне и по-дълбоко анализира ролята на затлъстяването, инсулиновата резистентност и участието на адипокините в етиопатогенезата на СПЯ, науката все още търси нови биомаркери, които да обогатят и развият познанията ни за сложните и комплексни механизми залегнали в синдрома. Едни от тях може да са адипокините - zonulin и meteorin-like protein, чиято роля вече е доказана в регулацията на метаболитните процеси.

Zonulin. Зонулин е наскоро открит протеин, аналог на произвеждания от *Vibrio cholera* - *Zonula occludens* токсин, и участва в регулацията на пропускливостта на червата и вероятно в патогенезата на някои автоимунни заболявания [152]. Установено е, че експресията на зонулин се повишава в чревните тъкани през острата фаза на цьолиакията [152]. Неотдавна се установи връзката между зонулин и метаболитните нарушения. Moreno-Navarrete et al. [153] изследват връзката между този протеин със затлъстяването и инсулиновата резистентност. В изследването се установява, че нивата на зонулин са значително повишени сред пациентите със

затлъстяване и предиабет, като положителна корелация се установява между инсулиновата резистентност и възпалителните маркери като IL-6. Доколкото е известно до този момент има само две проведени проучвания, изследващи серумни нива на зонулин сред пациенти със СПЯ. Zhang et al. [154] докладват за значително повишени нива на зонулин сред жени със синдрома в сравнение с контролите и демонстрира силна корелация с инсулиновата резистентност, затлъстяването, дислипидемията и тежестта на менструалните нарушения при СПЯ, спекулирайки, че нарушеният пермеабилитет на червата може да играе роля в патофизиологията на СПЯ. Cetin et al. [155] съобщават противоположни резултати. Те докладват за липса на сигнификантност в изследваните групи – здрави и жени със СПЯ, като в заключение авторите посочват, че зонулин не може да бъде надежден диагностичен маркер при жените със СПЯ и липса на данни за метаболитен синдром.

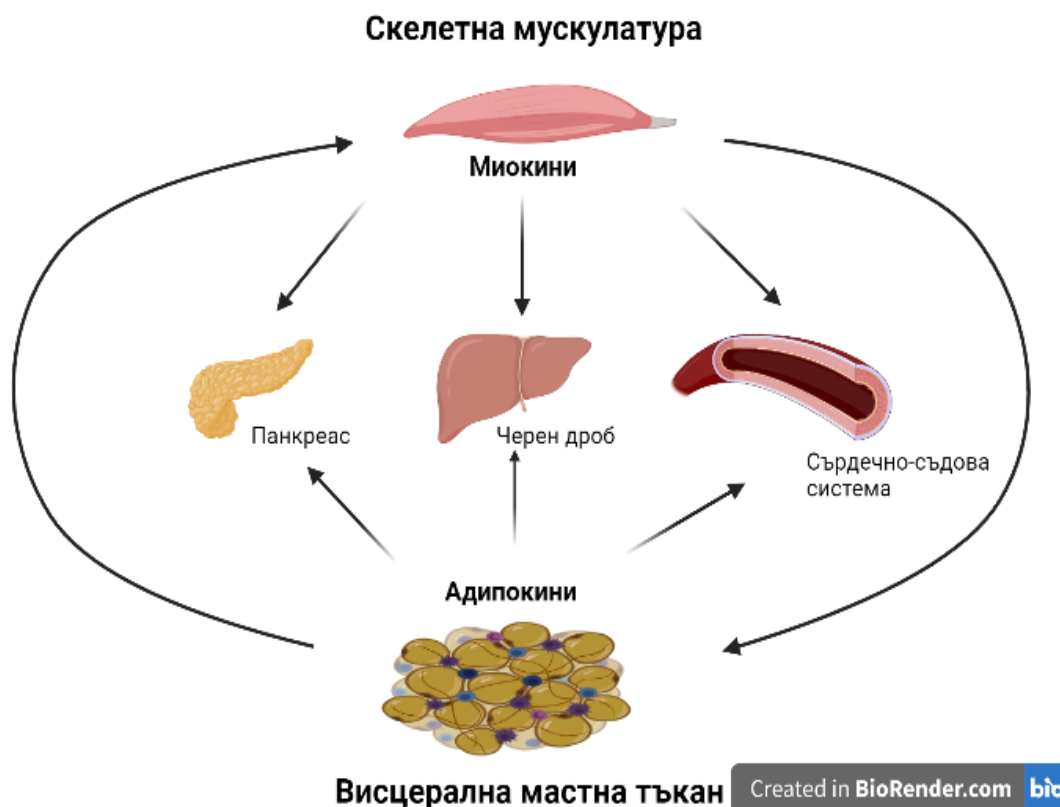
Meteorin-like protein. Meteorin-like protein (Metrnl) е нов имунорегулиращ адипокин, секретран от белите адипоцити, активираните моноцити и макрофаги [156]. Той увеличава енергийния разход и подобрява инсулиновата чувствителност, индуцирайки експресията на гени, свързани с термогенезата на кафявата мастна тъкан при мишки [157]. Това откритие създава хипотезата, че Metrnl е възможно да играе роля в патофизиологичните процеси на метаболитните заболявания, в това число на захарния диабет тип 2. Резултатите от публикуваните до момента проучвания показват, че серумните нива на Metrnl са повишени при пациенти със ЗД тип 2, но съществуват и противоречиви данни. Lee et al. [158] и Zheng et al. [159] съобщават за по-ниски серумни нива на Metrnl при пациенти с новодиагностициран ЗД тип 2, докато Chung et al. [160] установяват повишени серумни нива на Metrnl. Също така, в предклинични проучвания ефектите на Metrnl върху мастната тъкан при мишки показват, че секрецията на Metrnl от адипоцити може да увеличи чувствителността към инсулин чрез стимулиране на peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) рецепторите [161]. От друга страна, свръхсекрецията на Metrnl има обратните ефекти - намалява липогенезата и инхибира експресията на PPAR γ в човешките адипоцити, с което е възможно да доведе до хиперинсулинемия и инсулинова резистентност [162].

До този момент има само едно проучване, изследващо нивата на Metrnl сред жени със СПЯ. Резултатите от изследването показват, че нивата на цитокина са били сигнификантно по-ниски сред жените със СПЯ, спрямо здравите контроли. Metrnl негативно е корелирал с нивата на инсулина и кръвната захар на гладно сред СПЯ-групата и позитивно с ИТМ, нивата на адипонектина и хомоцистеина в контролната група [163].

1.4.3. Мускулът като ендокринен орган

Скелетната мускулатура е най-големият орган в тялото на незатлъстелите хора. Днес тя се възприема и като активен ендокринен орган поради функцията ѝ да синтезира и освобождава в циркулацията множество цитокини и други пептиди, наречени миокини [164]. Миокините са част от сложната комуникационна мрежа в тялото, която свързва скелетните мускули с други органи като мастната тъкан, черния дроб и панкреаса [164] (**Фигура 1.4**).

Последните проучвания показват, че миокините като иризин, интерлевкин (IL)-13 и IL-15, са дълбоко ангажирани в метаболизма на глюкозата и липидите по автокринни, паракринни и ендокринни механизми [165, 166]. Предполага се, че посредством контракциите се осъществяват секреторните функции на скелетните мускули и така вероятно се проявяват здравословните ефекти на физическата активност [167]. Ролята на миокините в патогенезата на СПЯ остава все още малко изследвана област, но все пак в литературата има данни относно ролята на иризин, миостатин и IL-13 и по-малко проучени остават IL-15, мионектин и brain-derived neurotrophic factor (BDNF).



Фигура 1.4. Взаимовръзка между скелетната мускулатура, висцералната мастна тъкан, черния дроб, панкреаса и сърдечно-съдовата система Миокините и адипокините, секретирани от мускулната и мастната тъкани, играят важна роля в метаболитните процеси, с което повлияват и функцията на панкреаса, черния дроб и сърдечно-съдовата система. Допълнително те имат важна роля в поддържането на балансирано съотношение между мускулния и мастния състав на тялото. Създадена с BioRender.com

Мионектин. Мионектинът е миокин, хомоложен по структура на адипонектина, който се експресира и секретира предимно от мускулните тъкани. Съобщава се, че експресията и плазмените нива на мионектина подлежат на метаболитен контрол [168]. В проучване при мишки, Seldin et al. [169] установяват, че храненето след нощно гладуване повишава експресията и плазмените нива на мионектин. Допълнително инфузията на рекомбинантен мионектин *in vivo* понижава циркулиращите нива на свободни мастни киселини (FFA), отчасти чрез повишаване поглъщането на липиди от клетките, както и регулиране експресията на гени, участващи в усвояването на липидите [169]. Нивата на циркулиращия мионектин се

увеличават значително при затлъстели/диабетни животни [169, 170]. Тези доклади предполагат, че мионектинът е цитокин, чиято регулация се повлиява от хранителни вещества и може да има функционална роля при инсулинова резистентност.

На този етап в литературата се намира едно проучване на миокина сред жени със СПЯ. Нивата на мионектина са били значително по-ниски при пациенти със СПЯ, в сравнение със здрави контроли. Мионектинът е показал обратна връзка с ИТМ, инсулиновата резистентност, FАI и триглицеридите, докато позитивна връзка е установена само с high-density lipoprotein (HDL-C). Логистичен регресионен анализ разкрива, че с намаляване на нивата на мионектина се увеличава риска от развитие на синдрома. В заключение авторите посочват, че ниските нива на мионектин са свързани с метаболитните и хормонални нарушения при жените със СПЯ, което предполага, че мионектинът може да играе роля в патофизиологията на синдрома [171].

IL-15. IL-15 е миокин, член на семейството на IL-2, който се силно експресира в скелетните мускули и се секретира от първичните мускулни клетки. IL-15 се произвежда също и от много други клетки и тъкани в тялото [172]. Секретираният от скелетните мускули IL-15 повлиява процесите в мастната тъкан, където стимулира редукцията на мастната маса, потиска адипогенезата и така намалява нивата триглицеридите и very low density lipoprotein (VLDL)-холестерола в кръвта [173], главно чрез uncoupling protein (UCP) и PPAR- δ сигнални пътища [174]. Освен това в скелетните мускули и черния дроб IL-15 може да подобри инсулиновата чувствителност [175] и последващия транспорт и използване на глюкоза, като по този начин подобрява хомеостазата на глюкозата чрез активиране на glucose transporter type 4 (GLUT4) чрез Janus kinase-3/Signal transducer and activator of transcription 3 (Jak3/STAT3) [176]. При животински модели и хора е доказано, че IL-15 подобрява метаболизма на липидите и глюкозата, инсулиновата чувствителност, засилва митохондриалната активност и намалява възпалението в бялата мастна тъкан [176]. Плазмените нива на IL-15 са значително намалени при хора със затлъстяване [177] и отрицателно са корелирали с мастната маса [178]. Счита се, че IL-15 може да бъде надежден терапевтичен таргетен метаболит за профилактика и лечение на затлъстяване, захарен диабет тип 2 и СПЯ, като до този момент няма данни да са

провеждани изследвания сред жени със синдрома в контекста на метаболитните промени.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF). BDNF е член от семейството на невротрофичните фактори, който се синтезира от скелетните мускули и секретира при тяхната контракция [179]. BDNF регулира невроналната диференциация и синаптичната пластичност, а намалените му нива участват в патогенезата на болестта на Алцхаймер и други разстройства [180]. Съобщава се, че BDNF увеличава фосфорилирането на AMP-activated protein kinase (AMPK) и ацетил КоА карбоксилазата, засилва окисляването на мазнините [181], регулира метаболизма на глюкозата и подобрява чувствителността към инсулин [182]. При затлъстели мишки с диабет BDNF намалява приема на храна и намалява нивата на кръвната захар [183]. В изследване при хора плазмените нива на BDNF се установяват намалени сред лицата със затлъстяване и захарен диабет тип 2, като е наблюдавана негативна корелация между тях и нивата на свободните мастни киселини и инсулинова резистентност [184]. Освен това е установено, че по-ниските нива на BDNF са свързани със затлъстяване и диабетни усложнения [185]. Доколкото ни е известно, проучвания относно метаболитните ефекти на BDNF сред жени със СПЯ до този момент не са провеждани.

Допълнително ролята на невротрофина се оказва особено важна и във фоликулогенезата и овогенезата. Той се експресира в яйчниците и по-конкретно от гранулозните клетки на преовулаторните фоликули [186]. Редица наблюдателни проучвания [187-189] предполагат, че BDNF вероятно е физиологичен регулатор на нормалното фоликуларно зреене [190]. Измерван е и във фоликуларна течност. Плазмените нива на невротрофина са динамични през менструалния цикъл - по-високи са през лутеална фаза и по-ниски във фоликуларна фаза [191], като полуживотът му в кръвта подкрепя хипотезата, че това покачване на нивата му през лутеална фаза е свързано с повишената му продукция от яйчника [192]. В допълнение на това са данните, че по време на аменорея или в менопаузална възраст се отчита нарушение в лутеалното покачване на нивата му [191], докато хормонално-заместителна терапия е възможно да повиши изначално ниските нива на BDNF при менопаузални жени приблизително до тези, измервани във фоликуларна фаза [191-194]. В друго

изследване е докладвана сходна тенденция в плазмените нива на BDNF през фазите на менструалния цикъл [195].

В проучване, проведено сред жени със СПЯ и здрави контроли, са изследвани плазмени и фоликуларни нива на BDNF. Резултатите са показали, че при пациентите със СПЯ нивата на невротрофина са сигнификантно по-високи в сравнение със здравите контроли. Хипотезата на авторите е, че повишението им е свързано с повишеното съотношение ЛХ/фоликулостимулиращ хормон (ФСХ) при жените със СПЯ, като вероятно високите нива на ЛХ повишават и секрецията на BDNF от гранулозните клетки. Допълнително се предполага, че повишените нива на невротрофина може да водят до пролиферация на гранулозните клетки и с това да имат отношение към фоликулогенезата [196].

1.4.4. Роля на андрогенната свръхпродукция в патогенезата на СПЯ

Макар ИР и хиперинсулинемията да се смятат за ключови патогенетични механизми при СПЯ, някои факти все още остават необясними. Диагнозата СПЯ не се установява при всяка жена с ИР и хиперинсулинемия и обратното, метаболитните нарушения не са задължителни при всички жени със синдрома [197, 198]. Всъщност тези данни по-скоро опровергават едностранното участие на ИР и хиперинсулинемията в патофизиологията на синдрома, а насочват към предполагаема роля и на други фактори. Първичен дефект, обуславящ андрогенна свръхпродукция, [199] се счита, че има важна функция в генезата на синдрома, при която инсулинът и други фактори действат като тригери [200].

Най-интересната хипотеза за патогенеза на синдрома е изказана от Frank et al. [201], според която СПЯ е генетично детерминирано овариално нарушение, характеризиращо се със свръхпродукция на андрогени. Неговата манифестация е хетерогенна, обуславяща се от връзката между генетични фактори и фактори на околната среда. Тази хипотеза се подкрепя от факта, че поликистозни яйчници се установяват сред момичета в предпубертетна възраст [201, ор202]. При изследване сред резус маймуни е демонстрирано, че хиперандрогенемията по време на интраутробното развитие на фетуса предопределя клиничната изява на СПЯ в adolescentна възраст. В друго изследване сред овце се установява също, че

свръхекспозицията на андрогени във феталния период повлиява ранната фоликуларна активност на яйчниците и това може да обясни типичните нарушения във фоликулогенезата, наблюдавани при СПЯ [201, 202].

При здрави жени фетусът е протектиран от интраматочна андрогенна свръхекспозиция посредством два механизма: плацентарната ароматаза и високите майчини концентрации на SHBG [203]. Сред жени със СПЯ ароматазната активност на плацентата е намалена [204] и в резултат на това адекватна протекция на фетуса от свръхекспозиция на андрогени не би могла да се постигне [205].

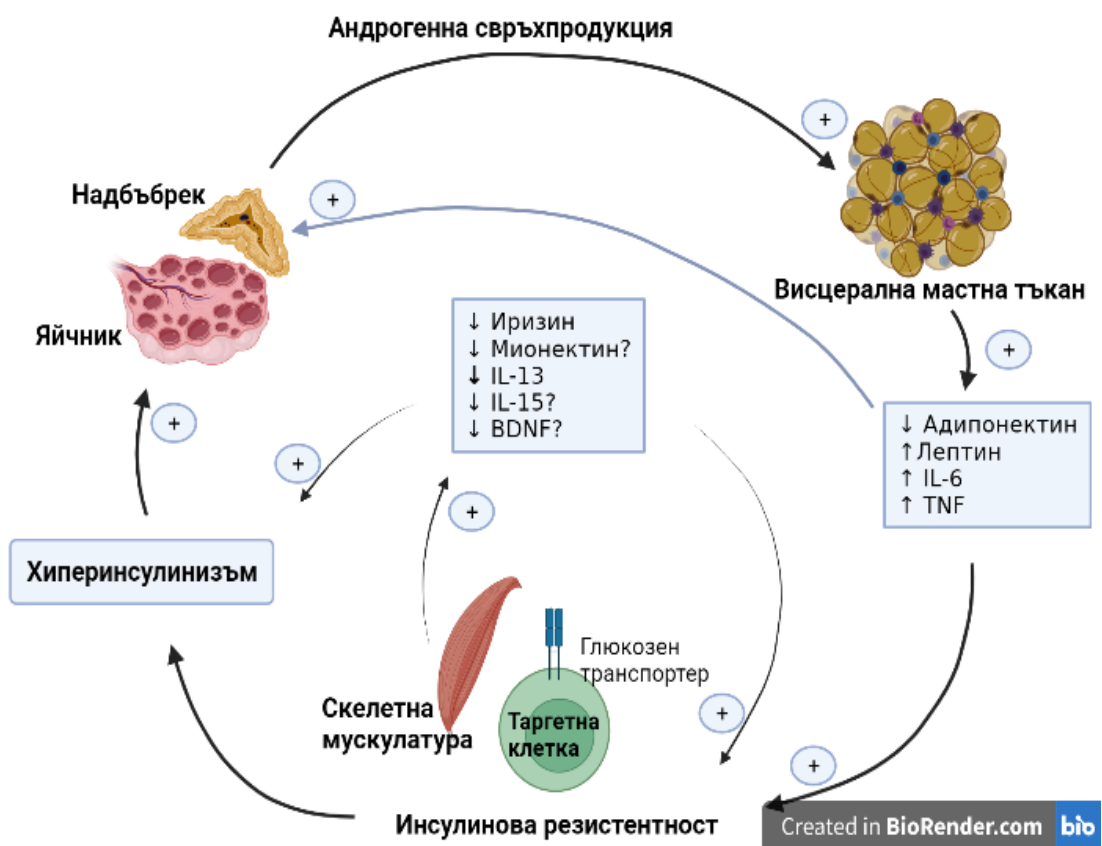
Критичен период за правилната органна диференциация е вторият триместър на бременността. В този период андрогенният ексцес сред женски фетуси може да се асоциира с гестационна хипергликемия и фетална хиперинсулинемия [203]. Интерес представляват данните, че високите тестостероновы нива в средата на бременността при майката са предиктор за високи нива на АМХ при подрастващите им дъщери [206].

Базирайки се на хипотезата, че хиперандрогенизмът *in utero* може да бъде фактор за репрограмане във феталната репродуктивна тъкан, се предполага, че в зряла възраст това вероятно води до оформяне на СПЯ-фенотипа. В допълнение влияние оказват и генетични фактори (свързани с инсулинова резистентност), както и фактори на околната среда (например: диета) [203].

Изявата на СПЯ обичайно настъпва в пубертетна възраст, когато хипоталамо-хипофизо-гонадната ос се активира. В този период се оформят и метаболитните прояви, свързани с преразпределение на мастната тъкан. В пубертета физиологично се наблюдава повишаване на инсулиновите нива, което от една страна води до намаляване на нивата на SHBG и амплифициране ефектите на циркулиращите андрогени и от друга страна - стимулация на овариална стероидогенеза [207]. При жени със СПЯ се предполага, че физиологично наблюдаваната хиперинсулинемия в пубертетна възраст може да е била тригериращ фактор за последващата поява на хиперандрогенемия и ановулация [207].

Несъмнено хиперандрогенизмът е ключов фактор при СПЯ, тъй като играе водеща роля както в изявата на овариалната дисфункция и кожните прояви (хирзутизъм, акне и алопеция), така и в появата на ИР и метаболитните нарушения

при СПЯ, предопределяйки повишената абдоминална и висцерална мастна тъкан [208, 209]. Най-вероятно двата механизма (хиперандрогенизъмът и ИР) са взаимно свързани в един порочен кръг, в който андрогенният ексцес увеличава висцералната мастна тъкан и абдоминалния обезитет и с това обуславя честите метаболитни нарушения, а ИР и хиперинсулинизмът от своя страна усилват яйчниковата и адреналната андрогенна продукция [200], онагледени на **фигура 1.5**.



Фигура 1.5. Взаимовръзка между хиперандрогенизъм и абдоминалния обезитет при СПЯ Андрогенният ексцес увеличава висцералната мастна тъкан, която от своя страна отделя в циркулацията повече проинфламаторни адипокини, водещи до инсулинова резистентност в таргетните клетки. Инсулиновата резистентност на ниво скелетна мускулатура се асоциира с намалена секреция на миокините, които имат предимно антиинфламаторен ефект и по този начин метаболитните нарушения се задълбочават. На яйчничково и надбъбречно ниво андрогенна свръхпродукция е потенцирана чрез директни механизми (сива стрелка) (чрез автокринни, паракринни и ендокринни медиатори, като понижения адипонектин, повишения тумор-некротичен фактор (TNF), интерлевкин-6 (IL-6) и лептин) или чрез индиректни механизми като инсулиновата резистентност и компенсаторна хиперинсулинемия. По този начин се оформя един порочен кръг (черни стрелки) между андрогенния ексцес и висцералния обезитет. Създадена с BioRender.com

1.4.5. Нарушение в секрецията на гонадотропините

Физиологично незрелият фоликул се превръща в зрял под въздействието на няколко хормона, особено важна роля от които имат ФСХ, отговорен за нормалния фоликуларен растеж, и ЛХ с т.нар. ЛХ-пик, необходим за настъпването на овулацията. Двата гонадотропина се секретират от хипофизата, стимулирани от пулсативно секретирания от хипоталамуса гонадотропин-рилийзинг хормон (ГнРХ).

Според т.нар. невроендокринна теория хормоналните нарушения при СПЯ може да се дължат на повишена пулсативна секреция на ГнРХ, който от своя страна повишава честотата и амплитудата на ЛХ за сметка на ФСХ. Това има за резултат повишаване на ЛХ/ФСХ съотношението, което по-често се наблюдава при слаби, необезни момичета със СПЯ [210]. Повишеното съотношение ЛХ/ФСХ и резистентността на яйчниците към ФСХ допълнително създава условия за стимулиране синтеза и секрецията на андрогени от тека-клетките на овариалните фоликули. Експесивната андрогенна синтеза в яйчника от своя страна нарушава фоликуларния растеж. Физиологичната роля на ФСХ е да стимулира фоликуларния растеж, както и да спасява от атрезия група примордиални фоликули. Фоликули с размери между 2-5 мм са чувствителни към ФСХ, докато фоликули с по-големи размери (6-8 мм) имат активна ароматаза и могат да секретират естрадиол и инхибин В, които на свой ред в късен фоликуларен стадий водят до редукция в нивата на ФСХ. При СПЯ високите нива на ЛХ и респективно ниските на ФСХ водят до ранна диференциация на фоликулите и преждевременен фоликуларен арест [211]. Хиперсекрецията на ЛХ води до ранна лутеинизация на гранулозните клетки и с това допринася за ранен арест в растежа на антралните фоликули. ЛХ може също да активира ранна мейоза на овоцита, което да наруши неговото качество и да е причина за формиране на ембрионални анеоплоидии [212]. Допълнително липсата на инхибиращ ефект на прогестерона върху индуцираната пулсативна секреция на ГнРХ допринася за развитието на т.нар. СПЯ-фенотип [213].

Не е ясно обаче дали първоетапното нарушение е в оста хипоталамус-хипофиза-яйчник или то е следствие на първично нарушение в стероидната хормонална секреция. Данните за наблюдавана увеличена пулсативна секреция на ЛХ

с повишена ежедневна честота сред момичета с хиперандрогенизъм в ранен период на пубертета предполага, че невроендокринните нарушения са първични поне при една част от жените със СПЯ [50].

Наскоро проведено проучване сред българска популация жени със СПЯ показва, че генетичните полиморфизми на ЛХ/Хорионгонадотропин рецептора (LHCGR) влияят върху фенотипната изява на СПЯ, особено сред пациентите с обезитет. Хетерозиготните пациенти с генетичен вариант rs2293275 p.Ser312Asn имат по-често инфертилитет спрямо хомозиготните форми за същия полиморфизъм. Той е показал също асоциация с инсулиновите нива при пациенти със СПЯ и затлъстяване. Този генетичен вариант може да модулира ЛХ/ФСХ отношението и по този начин да повлиява клиничните и метаболитните прояви при СПЯ, особено сред жените със затлъстяване и наднормено тегло [214].

1.4.6. Интраовариални нарушения

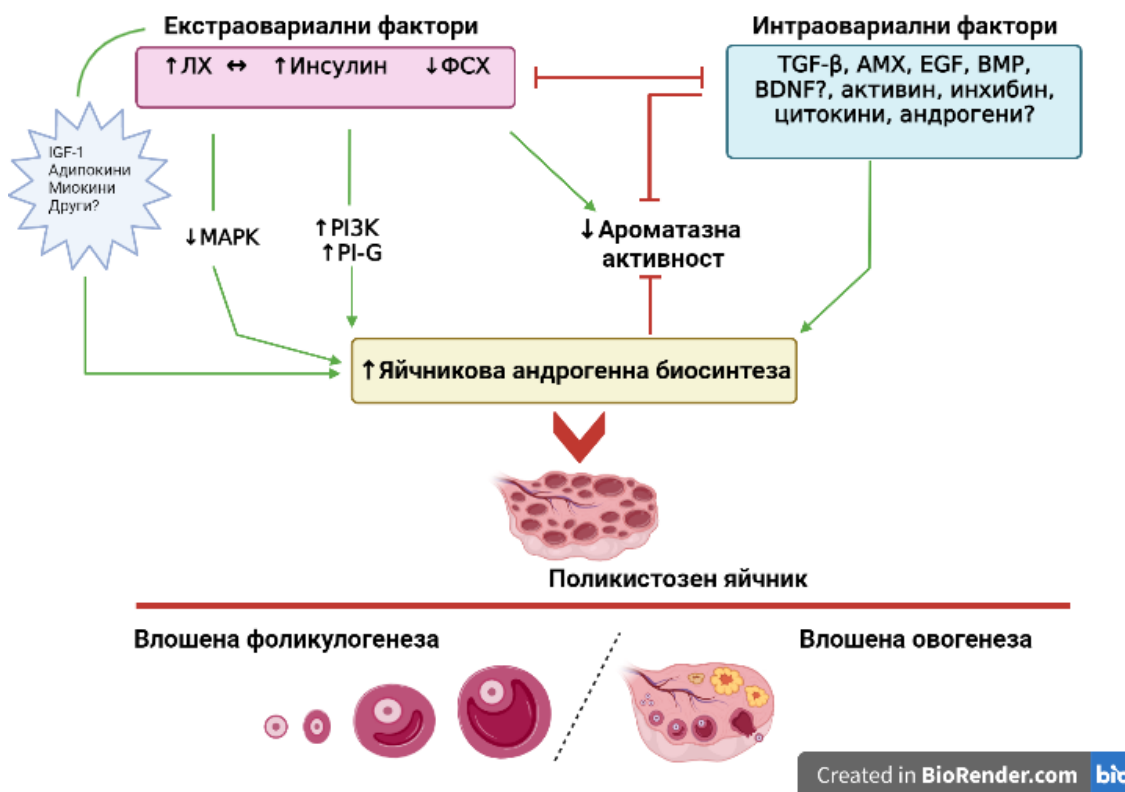
Овариалната фоликулогенеза изисква деликатен баланс между екстра- и интраовариални фактори. Научните данни, които са анализирани дотук, ясно показват, че нарушенията в този баланс водят и до нарушения във фоликуларното развитие, формирането на зрели овоцити и съответно до инфертилитет. Представените по-горе екстраовариални фактори като инсулиновата резистентност с хиперинсулинемията, метаболитните нарушения, висцералният обезитет с нарушената секреция на адипокини и миокини и невроендокринните нарушения [215] самостоятелно или комбинирано влошават фоликуларния микроклимат и съответно фоликулогенезата и овогенезата.

Докато описаните нарушения са външни за яйчника, хиперандрогенизмът, който е най-типичното хормонално нарушение при СПЯ, има предимно овариална генеза. В най-голяма степен повишените нива на тестостерон и андростендион се дължат на увеличената тека-клетъчна андрогенна синтеза в яйчника. Надбъбрекът допринася в по-малка степен за хиперандрогенизма при СПЯ, белег за което са повишените нива на DHEAS и отчасти тези на андростендиона. Биосинтезата на андрогени е медирана от ензима P450c17, който катализира 17-20 лиазата. Нарушението в транскрипционното и пост-транскрипционното ниво на ензима се

счита, че може да бъде фактор в етиологията на СПЯ [216]. Сред тези жени се установява релативна инхибиция в 17-20 лиазната активност и по-специално в 17-хидроксилазата, което води до повишено съотношение 17-ОН-прогестерон/андростендион. Приложението на ГнРХ или хорионгонадотропин при жени със СПЯ води до ексцесивна продукция на 17-хидроксипрогестерон [217]. Съществуват данни, че при жени със синдрома ензимната активност на ароматазата, която превръща андрогените в естрогени, е ниска и това допълнително повлиява хиперадрогенизма при СПЯ [216, 218].

Както екстраовариалните фактори са важни за правилната фоликулогенеза и овогенеза, така и редица интраовариални фактори влияят върху тези процеси. Наричат се още фоликуларни флуидни фактори (follicular fluid factors (FFFs)) [215], чиито фоликуларни нива в повечето случаи корелират с плазмените им нива [215]. Интраовариалните фактори, които модулират фоликуларното развитие и зреене, включват представители от суперфамилията на трансформирания растежен фактор – бета (например: АМХ, инхибин, активин, костен морфогенен протеин и растежни диференциращи фактори) [50]. Счита се, че IGF-1, различни цитокини и стероидни хормони, вероятно също играят роля в абнормния фоликуларен растеж и функционалност, наблюдавани при СПЯ [219]. Овоцитът и обграждащите го гранулозни клетки продуцират много от тези интраовариални фактори [220] и именно добрият „диалог“ между тях е ключовият механизъм за нормалния фоликуларен растеж [221, 222].

Допълнително този процес се влияе от нарушената координацията между ЛХ, ФСХ, IGF-1, АМХ, ензимите, ангажирани в андрогенната конверсия, и други предполагаеми фактори, наблюдавани при СПЯ. Пример за това е фактът, че резистентността на фоликулите към ФСХ най-вероятно е вторична проява на повишените нива на АМХ, секретирани от голямата кохорта преантрални фоликули, или на хиперадрогенизма в яйника [1, 216]. Всичко това има за резултат нередовно настъпване на овулация (олигоовулация) или липса на такава (ановулация) и като най-важна последица от това - инфертилитет или субфертилитет [219] (**фигура 1.6**).



Фигура 1.6. Влияние на екстраовариални и интраовариални фактори в яйчниковата фоликулогенеза и овогенеза при СПЯ Потискане на mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K1) в овариалните тека клетки, медирано от повишените нива на лутеинизиращия хормон (ЛХ), се последва от повишена андрогенна синтеза. Повишената интрацелуларна активност на phosphoinositide 3-kinase (PI3K) и phosphoinositol glycan (PI-G), потенцирана от хиперинсулинемията, също води до повишена тека-клетъчна андрогенна активност. Инсулинът допълнително амплифицира ефектите на ЛХ. Понижените нива на фоликулостимулиращия хормон (ФСХ) потискат ароматазната активност, важна за превръщането на андрогените в естрогени, и по този начин повишава също андрогенната биосинтеза. Други екстраовариални фактори като IGF-1, адипокини и миокини също повлияват в известна степен овариалната андрогенна биосинтеза. От друга страна интраовариални фактори като антимюлеров хормон (AMX), различни растежни фактори, инхибини, активини и други влияят директно или индиректно чрез ароматазната активност върху синтезата на андрогени в яйчника. Самостоятелно AMX може директно да стимулира андрогенната биосинтеза от тека клетките. Крайните ефекти от тези нарушения са потискане на нормалното протичане на процесите на фоликулогенеза и овогенеза и формиране на поликистозна морфология на яйчника. Зелените линии показват стимулиращия ефект, докато червените линии – потискащия. Съкращения: AMX - антимюлеров хормон; ЛХ - лутеинизиращия хормон; ФСХ - фоликулостимулиращия хормон; BMP – bone morphogenic protein; BDNF – brain-derived neurotrophic factor; EGF – epidermal growth factor; IGF-1 – insulin-like growth factor 1; MAP2K1-mitogen-activated protein kinase 1; PI3K - phosphoinositide 3-kinase; PI-G - phosphoinositol glycan; TGF- β – transforming growth factor- β . Създадена чрез BioRender.com

1.4.7. Ендоканабиноидна система

➤ Общ преглед

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

Основните ендоканабиноидни лиганди са два. N-арахидоилетаноламин, още познат като анандамид (AEA), е първият открит ендоканабиноид, изолиран от свински мозък през 1992г. [223], последван след това от втория изолиран ендоканабиноид - 2-арахидоноилглицерол (2-arachidonoylglycerol, 2-AG) през 1995г. [224, 225]. Прекурсор на AEA е N-арахидоилфосфатидилетаноламин (NAPE), който посредством NAPE-хидролизираща фосфолипаза D (NAPE-PLD) се хидролизира до анандамид. Синтезираният AEA се отделя в екстрацелуларното пространство, където той може да действа по автокринен или паракринен път чрез активация на канабиноидните рецептори. 2-AG се отделя също от мембраните „on demand” след конверсия на диацилглицерол в 2-AG чрез sn-I-диацилглицерол липаза (sn-I-diacylglycerol lipase, DAGL).

Биологичните ефекти на AEA и 2-AG се осъществяват първо след захващането им от клетката, посредством предполагаеми ендоканабиноид-мембранни транспортери (EMT) [226]. Ендоканабиноид-медираните ефекти се прекъсват бързо чрез интрацелуларна ензимна деградация. Основният ензим, разграждащ AEA, е amid-хидролаза на мастните киселини (fatty acid amide hydrolase, FAAH) [227] и за 2-AG – моноацилглицерол липаза (monoacylglycerol lipase, MAGL) [228]. Ендоканабиноидите активират същите G-протеин рецептори (CB1R и CB2R), с които се свързва психоактивното вещество на канабиса - Δ^9 -тетрахидроканабинол [229].

Първоначално се е смятало, че първичната локализация на CB1R е била в централната нервна система, а CB2R се локализира в клетките на имунната система. Днес се знае, че двата рецептора са разпространени в много други органи и системи и дори те могат да съществуват едновременно върху повърхността на една и съща клетка.

CB1R се локализира също в периферните тъкани като яйчници, ендометриум, тестис, черен дроб, сърце, тънки черва, пикочен мехур и периферните клетки като лимфоцитите [230-232].

CB2R са изолирани за първи път от слезка на плъх и човешки миелоидни клетки [233] и затова се е смятало, че основно се експресира в имунната система. CB2R също са установени и в редица други тъкани, като ЦНС [234], ембрионални стволови клетки [235], плацента [236], миометриум [237], яйчник [238], стомашно-чревен тракт [239], черен дроб [240] и сърце [241].

➤ ***Физиологична роля на ендоканабиноидната система***

Ендоканабиноидната система участва в регулацията на различни физиологични процеси, много от които са свързани с поддържане на хомеостазата, невропротекция, модулация на болковите възприятия, регулация на моторната активност и също контролиране на паметовите процеси в мозъка. Допълнително ендоканабиноидната система допринася за модулиране на имунната система и възпалителния отговор. Повлиява сърдечно-съдовата и респираторната система, посредством контролиране на сърдечната честота, артериалното налягане и бронхиалната функция [242] (**фигура 1.7**).

➤ ***Роля в храненето и енергийната обмяна***

Ендоканабиноидите участват в регулацията на процесите на хранене и енергийна обмяна, както на централно, така и на периферно ниво. CB1R са локализирани във всички мозъчни структури, ангажирани в контрола на апетита, включващи хипоталамуса [244], nucleus arcuatus [245], вагусовия нерв и други мозъчни центрове контролиращи ситостта посредством нервни сигнали от гастроинтестиналния тракт [246]. Изследвания показват, че нивата на ендоканабиноидите в мозъка се увеличават под влияние на остър или хроничен стрес, или токсична причина, което има за цел да възстанови „нормалната“ хомеостаза [247, 248]. Тези данни предполагат, че CB1R се активират при гладуване, за да регулират нивата на



Фигура 1.7. Влияние на ендоканабиноидната система върху различни процеси в човешкия организъм (Адаптирано от [243])

орексигенните и анорексигенните медиатори и по този начин да индуцират прием на храна [249]. Орексигенният ефект на ендоканабиноидите вероятно се осъществява посредством медиатора – неuropeпид Y [250]. Активирането и потискането на CB1R води до промяна в нивата му, като съответно ги увеличава или намалява [251, 252].

На периферно ниво ендоканабиноидите и CB1R са изолирани в множество клетки и тъкани, участващи в енергийната хомеостаза, в това число: черва [253], черен дроб и хепатоцити [254], бяла мастна тъкан [255, 256] и адипоцити [255, 257, 258, 259], скелетна мускулатура [260] и панкреас [255, 261]. AEA и 2-AG промотират липогенезата, докато CB1R антагонист усилва липолизата и стимулира глюкозния метаболизъм, посредством повишаване на афинитета и активацията на GLUT4 [257, 262, 263].

В обобщение би могло да се каже, че ендоканабиноидите във физиологични условия участват във „фината настройка“ на метаболитните процеси в тялото, но при свръхактивиране на системата изглежда, че допринасят за развитието на метаболитните нарушения и с това за оформянето на абдоминален тип обезитет, дислипидемия и хипергликемия. Плазмените нива на ендоканабиноидите е установено, че са повишени при хора със затлъстяване [264, 265] и при пациенти със захарен диабет тип 2 [266, 267]. Има данни също, че плазмените нива на 2-AG са повишени при лица с андроиден тип обезитет и негативно корелират с инсулиновата чувствителност, независимо от количеството на мастната тъкан [266, 268]. Допълнително в случаи на затлъстяване, индуцирано от повишен прием на храна, и двата показателя - лиганд и CB1R са показали свръхактивация [269]. Интересен е също фактът, че CB1R „knockout“ мишки са били резистентни към затлъстяване, индуцирано от повишен прием на храна [270]. Всички тези данни насочват към тясна връзка между обезитета и свръхактивацията на ендоканабиноидната система. Доказано е, че тя се реализира на ниво хипоталамус и периферни тъкани - мастна тъкан, панкреас, скелетна мускулатура и черен дроб [271].

Всички тези данни се потвърждават и с резултатите от клиничната практика с първия одобрен за клинична употреба CB1R-блокатор за лечение на затлъстяване - римоабант (SR141716A) [272]. Натрупаните данни от клиничните изпитвания с този препарат - RIO-Lipids, RIO-Europe, RIO-NorthAmerica и RIO-Diabetes [273, 274] са показали добри терапевтични ефекти на римоабант върху контрола на телесното тегло и благоприятно повлияване на сърдечно-съдовите рискови фактори [274, 275, 276]. Допълнителните ефекти, установени при лечение с римоабант, включват: подобрене в нивата на адипонектин, HDL, триглицериди и гликиран хемоглобин при пациенти със захарен диабет [273, 276]. Две години след регистрирането на препарата в Европа той е изтеглен от аптечната мрежа поради натрупаните данни за повишаване на депресивните епизоди и суицидния риск [277, 278].

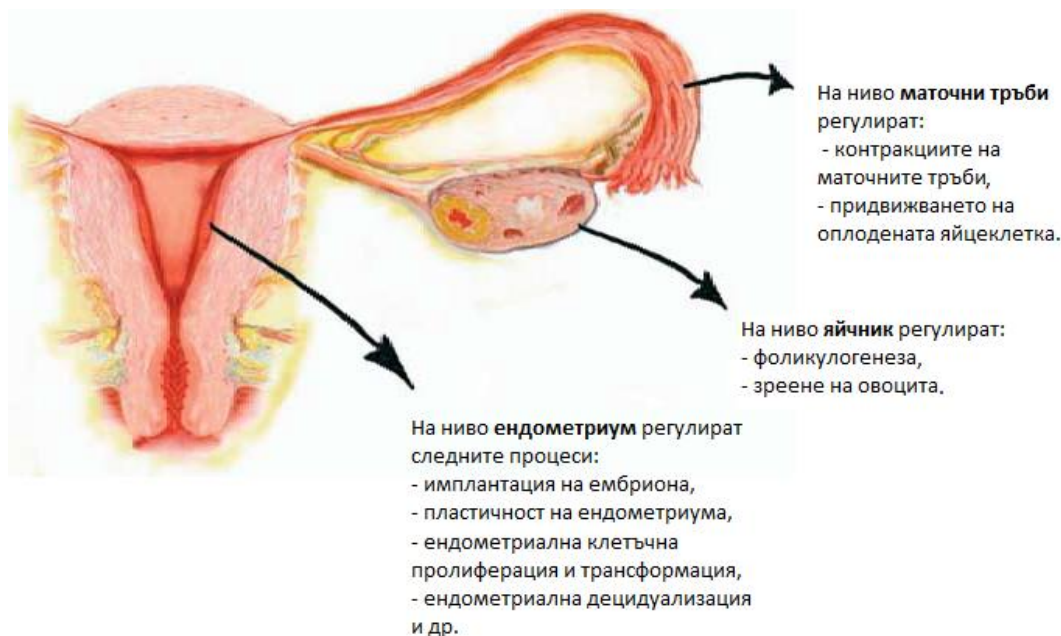
Към момента се провеждат изследвания в насока търсене на нов периферно действащ CB1-рецепторен блокатор за ефективно лечение на затлъстяването и свързаните с него усложнения, който да е с по-малка пенетрация през кръвно-

мозъчната бариера. Активацията на CB2-рецепторите от друга страна се предполага също, че може да има благоприятен ефект върху телесното тегло и затова фармацевтичната индустрия разработва CB2-рецепторни агонисти за лечение за затлъстяването [272].

➤ ***Ендоканабиноидите в женския репродуктивен тракт***

Ендоканабиноидите играят важна роля в няколко процеса в женския репродуктивен тракт, включващи фоликулогенеза, овулация, зреене на овоцита, имплантация и ранна бременност [273, 279-283] (**фигура 1.8**).

Плазмените нива на АЕА варират през менструалния цикъл, като са най-високи във фоликуларна фаза [285, 286]. Това е от особено значение за реализиране на бременност [283]. Високите плазмени нива на АЕА и свързаната с това по-ниска активност на FAAH в периода на имплантация на ембриона се асоциират с повишен риск от спонтанен аборт. Тази връзка е потвърдена в две проучвания. Първото докладва, че жени със спонтанен аборт са имали по-ниска FAAH-активност спрямо здрави контроли [287]. Второто проучване сравнява нивата на АЕА сред жени с предстояща IVF/ICSI процедура. При тези от тях с реализирана бременност са измерени по-ниски нива на АЕА спрямо жените с неуспех от in-vitro процедурата [237].



Фигура 1.8. Най-важни биологични ефекти на ендоканабиноидите в женския репродуктивен тракт (Адаптирано от [284])

В обобщение - ниските нива на АЕА подпомагат маточната рецептивност и са необходими за поддържане на бременността, докато около периода на термин високите нива на АЕА са необходими за раждането, вероятно поради хидролизата, на която се подлага анандамида и от това на покачващите се нива на простагландините [271].

➤ ***Нива на ендоканабиноидите в яйчника и фолликулярната течност***

Количество на АЕА е определяно във фолликулярна течност, посредством аспирация при жени, подлагащи се на IVF-процедура [288]. Изследванията са показали, че цялата ендоканабиноидна система е активна на ниво яйчник. CB1R и CB2R, както и NAPE-PLD и АЕА са били идентифицирани в яйчниковата тъкан [282]. Имунологично е локализирана експресията на CB1R и CB2R в медулата и кортекса на яйчника. В кортекса рецепторите са експресирани върху гранулозните клетки на примордиалния, първичния, вторичния и третичния фоликул, както и върху тека-клетките на вторичен и третичен фоликул. Двата рецептора са установени също в

corpus luteum и corpus albicans. NAF-PLD е експресиран в гранулозните и тека-клетките на вторичен и третичен фоликул, в corpus luteum и в corpus albicans, което предполага, че АЕА основно се продуцира от гранулозните клетки на растящите фоликули, но не и от овоцитите [282]. На базата на тези резултати се предполага, че АЕА може би играе роля в антралната фаза на фоликулогенезата.

Интересни са данните, че измерваните нива на АЕА във фоликуларна течност, аспирирана от фоликули на жени, подлагащи се на контролирана овариална стимулация за предстояща IVF/ICSI-процедура, са били по-високи във фоликулите със зрели овоцити, в сравнение с тези с незрели овоцити ($1,56 \pm 0,11$ срещу $0,99 \pm 0,09$ nM) [282]. Концентрация на АЕА от 1,09 nM във фоликуларна течност има предиктивна стойност за зрялост на овоцита в 77% от случаите, което подкрепя хипотезата, че нивата на АЕА във фоликуларна и оводуктална течност може да бъдат свързани със зрелостта на овоцитите [282, 288]. Тези ефекти на АЕА вероятно се осъществяват посредством свързване с CB2R, които са локализирани чрез имунохистохимичен анализ в овоцити на третичен фоликул, но не и върху такива в друга фаза на развитие [272].

➤ *Ендоканабиноидна система и СПЯ*

Преди повече от 10 години се заражда хипотезата за влиянието на ендоканабиноидната система в етиопатогенезата на СПЯ. Обещаващите добри метаболитни резултати от терапията с римонабант (Acomplia®) предполагат, че и при жените със СПЯ той ще доведе до намаляване на инсулиновата резистентност, телесното тегло, подобряване на липидния профил и повишаване на нивата на адипонектин. Последващите изследванията с римонабант сред жени със СПЯ и обезитет показват добри ефекти върху инсулиновата резистентност. Терапията с медикамента допълнително води до намаляване на нивата на аланин аминотрансферазата (АЛАТ) [289]. Допълнително се е считало, че нарушенията на хипоталамо-хипофизо-гонадна ос и променената пулсативност в секрецията на ГнРХ ще се повлияят благоприятно от терапията с CB1R-антагонист [290].

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

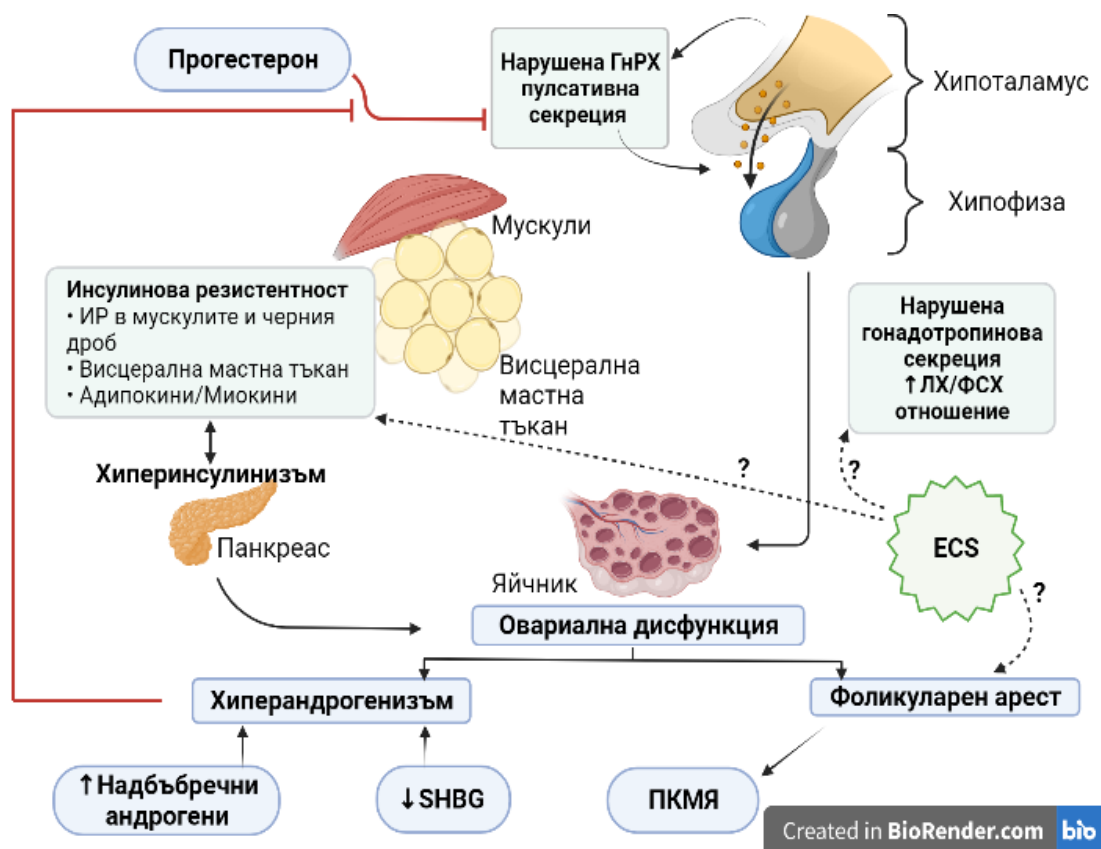
на СВ1R от АЕА в панкреасните бета-клетки може да индуцира инсулинова хиперсекреция и инсулинова резистентност [291, 292]. Тези наблюдения предполагат, че локалните ефекти на ендоканабиноидите на ниво панкреас може също да играят роля в СПЯ-асоциираната ИР. Ановулацията при СПЯ може да се дължи на комплексната връзка между ендоканабиноидите, лептиновата продукция и обезитета [293].

Въпреки изказаната хипотеза преди повече от десетилетие за връзка между ендоканабиноидната система и СПЯ, броят на научните изследвания в тази област остава все още ограничен. В проучване сред тайванска популация при жени със СПЯ е установено, че нивата на ендоканабиноидите - АЕА и 2-AG в периферни мононуклерани клетки са били по-високи спрямо тези при здрави контроли. Допълнително е установено, че повишена експресия на СВ1R в периферни мононуклеарни клетки и висцерална мастна тъкан е налице при жените със СПЯ, спрямо здравата популация. В същото проучване се открива позитивна корелация между експресията на СВ1 mRNA и нивата на ендоканабиноидите с тези на кръвната захар и имунореактивния инсулин на втория час в хода на ОГТТ. Авторите на проучването установяват, че СВ1R е единственият фактор, независимо асоцииращ се с инсулиновата резистентност. Въз основа на получените резултати те стигат до заключението, че ендоканабиноидната система е тясно свързана с инсулиновата резистентност при СПЯ [294].

Cui et al. (2017г.) изследват експресията на FAAH и СВ1R в ендометриум в трите фази на менструалния цикъл – менструална, пролиферативна и секреторна, като очаквано нивата на ензима са се повишавали сигнификантно в секреторната фаза, спрямо другите две фази. Тази тенденция е наблюдавана и при двете изследвани групи – жени със и без СПЯ. Авторите установяват също, че нивата на FAAH при жените със СПЯ са били значимо по-ниски във всяка фаза на менструалния цикъл, спрямо жените без СПЯ. Допълнително е установена сигнификантна позитивна корелация между инсулиновата резистентност (оценявана посредством QUICKI) и експресията на FAAH в пролиферативна и секреторна фаза на менструалния цикъл в групата със СПЯ. Това дава основания на авторите да предполагат, че FAAH играе

роля в генезата на инсулиновата резистентност при СПЯ [295]. В лонгитудинално проучване на същия авторски колектив се установяват по-високи изходни плазмени нива на АЕА при жени със СПЯ, сравнени с жени без СПЯ, но с инфертилитет. В нивата на 2-AG липсва сигнификантна разлика между двете групи. Ефектите, които са наблюдавани след 3-месечно комбинирано лечение с етинил естрадиол 35 мкг и ципротерон ацетат 2 мг в комбинация с метформин при жените със СПЯ, са били редуциране на нивата на АЕА и повишаване нивата на експресия на FААН в ендометриума [296].

В обобщение на анализа на данните относно патогенезата на СПЯ може да се каже, че точната етиопатогенеза на синдрома все още не е напълно изяснена. Предполага се участието на множество патофизиологични механизми, които зависят от различни фактори - генетични, метаболитни, ендокринни, фактори на околната среда [201]. Повечето от възможните механизми са преплетени един в друг, оформящи „порочен кръг”, в който всеки един от тях поддържа и задълбочава останалите. Вероятно обаче доминиращата роля на отделните механизми е в различна степен застъпена в генезата на синдрома при всеки пациент, т.е. при едни жени ще преобладават повече метаболитните прояви като ИР и хиперинсулинемия, докато в други случаи - предимно невроендокринните нарушения и хиперандрогенизма. Това предопределя и хетерогенността в клиничната картина при СПЯ. Допълнителен научен интерес събуждат ендоканабиноидите, определяни като новите потенциални биомаркери за инфертилитета [297], и ролята на ендоканабиноидната система като цяло в метаболитните и репродуктивните нарушения на СПЯ. **Фигура 1.9.** обобщава всички предполагаеми механизми в патогенезата на СПЯ.



Фигура 1.9. Обобщена схема на предполагаемите патофизиологични механизми при СПЯ Пулсативната секреция на ГнРХ от хипоталамуса е нарушена, което има за резултат повишена секреция на ЛХ от хипофизата и съответно повишено ЛХ/ФСХ отношение. Ефектите върху яйчниците са нарушена овариална функция и повишена андрогенна продукция. Инсулиновата резистентност и компенсаторната хиперинсулинемия чрез различни механизми директно и индиректно повишават андрогенната яйчникова продукция. Допълнително хиперандрогенизмът при СПЯ се влияе още от повишената надбъбречна андрогенна продукция и понижената чернодробна синтеза на SHBG. Отделяните от висцералната мастна тъкан и скелетната мускулатура адипо- и миокини повлияват в различна степен инсулиновата резистентност и хиперинсулинизма при СПЯ. Допълнително на ниво хипоталамус се установява своеобразна резистентност към инхибиращия ефект на прогестерона. Въпреки, че нивата на ФСХ остават нормални, голяма част от фоликулите в яйчника са резистентни към действието му, вероятно поради повишената секреция на антимюлеров хормон от тях. Ендоканабиноидната система се предполага, че има роля в няколко от патофизиологичните механизми при СПЯ, като влошава инсулиновата резистентност и повлиява оформянето на висцерален обезитет, нарушава пулсативната секрция на гонадотропните хормони и/или бива ангажирана във фоликуларния арест и оформянето на поликистозна структура на яйчниците. ГнРХ – гонадотропен рилийзинг хормон; ЛХ – лутеинизиращ хормон; ФСХ – фоликулостимулиращ хормон; ПКМЯ – поликистозна морфология на яйчниците; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; SHBG – секс-хормон свързващ глобулин; ECS – ендоканабиноидна система. Създадена чрез BioRender.com

1.5. Лечение

Участието на множество патофизиологични механизми и силно хетерогенната клинична картина при СПЯ предопределят лечебния подход да бъде индивидуализиран, насочен към водещите клинични признаци (хиперандрогенизма, менструалните нарушения, инфертилитета и/или метаболитните прояви) при конкретния пациент и ориентиран спрямо индивидуалните му нужди и очаквания (напр. наличие или липса на желание за концепция). Най-общо лечението на синдрома включва нефармакологични и фармакологични средства.

Хранене и двигателна активност. Промените в стила на живот, включващ спазване на здравословен режим на хранене и оптимална физическа активност, обичайно заемат водеща роля в терапевтичния режим при жените със СПЯ и данни на метаболитни нарушения.

Метформин. Понастоящем има много доказателства за ефекта на метформин в доза 1500-2500 мг/дневно при жени със СПЯ. Повечето от тях демонстрират повлияване на хиперинсулинемията, инсулиновата резистентност и серумните нива на андрогените в съчетание с понижени нива на ЛХ и повишение на SHBG [298]. Има данни и за висока честота на възстановяване на нормалния менструален цикъл, която в някои студии достига до 78%-96% [298-301]. Fleming et al. демонстрират повишаване броя на овулаторните цикли при приложение на метформин 2 x 850 мг дневно спрямо плацебо при 92 жени със СПЯ и олигоменорея [302]. Според препоръките на American Association of Clinical Endocrinologists (AACE)/American College of Endocrinology (ACE)/Androgen Excess and PCOS Society (AES) от 2015 г. метформин в доза 850 мг дневно при слаби подрастващи момичета може да бъде ефективен в редуциране на симптомите на СПЯ, докато при тези от тях с наднормено тегло или безитет дозата може да се повиши до 2,5 g дневно [16].

Тиазолидиндиони. Тиазолидиндионите са много ефективни за подобряване на инсулиновата резистентност, но имат слаб ефект по отношение постигането на редукция на тегло. С оглед потенциалните им странични ефекти, днес те не се препоръчват да се използват в рутинната практика за повлияване на инсулиновата резистентност при СПЯ [11].

Инозитол. Инозитоловите изомери са вторични посредници, участващи в няколко пътя на сигнална трансдукция в клетката, включително и на инсулина. Най-проучените представители на групата мио-инозитол и D-хиро-инозитол имат инсулиномиметично действие и намаляват нивата на постпрандиалната кръвна захар. При СПЯ има данни, че възстановяват овулацията, намаляват ендокринните и метаболитните нарушения и инсулиновата резистентност [303-306]. Двата инозитола във физиологично съотношение (мио-инозитол към D-хиро-инозитол = 40:1) играят важна роля в яйчника, като участват в процесите на зреене на овоцита, имплантацията и постимплантационно му развитие [307]. D-хиро-инозитол участва предимно в пострецепторната инсулинова сигнализация [308, 309] и инсулин-медираната андрогенна синтеза [310]. Мио-инозитол регулира глюкозното усвояване и сигнализацията на ФСХ [310, 311]. Мио-инозитол подобрява също овариалната функция и фертилитета [312-313], намалява степента на хиперандрогенизма, акнето и хирзутизма [314-316], благоприятно повлиява метаболитните параметри и модулира процесите на регулация на гонадната ос и с това на овулацията [317]. В последните години се натрупаха все повече данни, утвърждаващи терапията с инозитоли като нов, безопасен и ефективен метод за индукция на овулацията [305, 312, 318]. В проучване на Каменов и съавтори монотерапията с мио-инозитол увеличава честотата на овулацията на 61,7% сред жени със СПЯ и инсулинова резистентност при проследяването им в 3 спонтани менструални цикъла [305]. Въпреки много добрите ефекти на мио-инозитола върху метаболитните, хормоналните и репродуктивните параметри сред жените със СПЯ, 20-40% от тях може да са резистентни към лечението. Добавянето на алфа-лакталбумин, кломифен цитрат, рекомбинантен ФСХ може да бъде терапевтична алтернатива за преодоляване на резистентността към инозитол и постигане на овулация сред жените със СПЯ.

Комбинирани орални контрацептиви (КОК). КОК са първа линия на избор при пациентки с водещ хиперандрогенизъм в клиничната картина. Те имат ефект и върху по-голямата част от симптомите, които се наблюдават при пациентките със СПЯ в репродуктивна възраст – намаляват кожните прояви на хиперандрогенизма, регулират менструалния цикъл и осигуряват ефективна и сигурна контрацепция

[319]. Приложението на комбинирани препарати, съдържащи естрогени и прогестини, ефективно намалява серумните нива на андрогените. Освен това естрогените имат свойството да повишават SHBG, което води до намаление на свободния тестостерон. Нивата на SHBG често са понижени при пациентките със СПЯ в резултат на хиперинсулинемията. Прогестините инхибират 5 α -редуктазната активност, антагонисти са на андрогенния рецептор и повишават метаболитния клирънс на тестостерона и дихидротестостерона. Приложението на прогестини води до циклично кървене и предотвратява ексцесивната ендометриална пролиферация и хиперплазия. При наличие на затлъстяване ефективността на КОК-терапията може да бъде намалена в сравнение с тази при пациентки със СПЯ без затлъстяване. По-слабият терапевтичен отговор в тези случаи може да наложи включването на антиандроген.

В българско проучване сред жени със СПЯ е проследен ефекта от 6-месечно прилагане на различни лечебни подходи - КОК с антиандрогенна активност (Диане 35) самостоятелно или в комбинация с инсулинови очувствители (метформин и розиглитазон), върху хормоните на мастната тъкан, хипоталамичния медиатор неuropeпид Y (NPY), антропометричните пропорции, хормоналните и метаболитните отклонения [123]. В групата на лечение само с Диане 35 антропометричните параметри, вкл. тегло, количество и процент на мастна тъкан, обиколка на талията и отношението талия/ханш не търпят промяна в хода на 6-месечното лечение. Лептинът и NPY спадат сигнификантно, а резистинът и TNF α са с тенденция към спадане на третия месец от лечението, като по-нататъшните промени са несигнификантни. Тестостеронът и ЛХ показват известна тенденция към спадане, естрадиолът спада сигнификантно още на третия месец, докато по-нататъшните промени са несигнификантни. При анализа на резултатите с останалите хормонални показатели не се откриват значими разлики в хода на лечението.

В друго българско проучване са сравнени ефектите на три широко разпространени в практиката схеми за лечение при жени със СПЯ – КОК (Диане 35) самостоятелно или в комбинация с метформин или розиглитазон, върху теглото и телесните пропорции, хормоналните и метаболитните отклонения [122]. В групата на

лечение само с Диане 35 параметрите на теглото не се променят значимо в хода на лечението. Прилагането на Диане 35 в продължение на 6 месеца не води до покачване на тегло, респ. количеството и процента мастна тъкан, както и до промяна на съотношението талия/ханш. ЛХ, тестостеронът, DHEAS и 17ОН-прогестеронът показват тенденция към спадане, макар разликите да не достигат статистическа сигнификантност.

Антиандрогени. При неуспех от терапевтично повлияване на признаците на хиперандрогенизъм след 6 месечно лечение с КОК може да се добави към лечението антиандроген. Антиандрогените инхибират свързването на тестостерона и дихидротестостерона с андрогенните рецептори (спиронолактон, ципротерон ацетат, флутамид) или инхибират 5-алфа редуктазата (финастерид), с което инхибират превръщането на тестостерона в по-мощния андроген - дихидротестостерон. Трябва да се има предвид, че имат тератогенен ефект, инхибирайки нормалното развитие на мъжките полови органи, поради което трябва да се употребяват на фона на адекватен и сигурен контрацептивен метод.

СПЯ е сред най-честите ендокринни причини за инфертилитет при жените в репродуктивна възраст. Когато той е водещото нарушение при жената със СПЯ целите на лечението следва да са насочени към възстановяване на овулацията и постигането на едноплодна бременност.

Кломифен цитрат. Той е селективен естроген-рецепторен модулатор, който блокира отрицателната обратна връзка на ендогенния естрадиол между гонадите и хипоталамо-хипофизната ос, с което води до увеличаване на честотата и амплитудата на пулсовата секреция на ГнРХ, увеличава се продукцията на ЛХ, ФСХ и в крайна сметка настъпва овулация.

Летрозол. Летрозолът е ароматазен инхибитор, който също се използва за лечение на инфертилитет при жени със СПЯ. Той осъществява функционален блок на оста хипоталамус-хипофиза-яйчник и според данните от наскоро проведено голямо, мултицентрово проучване неговата ефективност превъзхожда тази на кломифен цитрат [320]. Въз основа на тези факти в съвременните ръководства летрозолът

измества кломифен цитрат и е предпочитано първо средство за индукция на овулацията [11].

Гонадотропини. Втора линия на лечение е гонадотропиновата терапия (комбинация от ЛХ и ФСХ или само ФСХ). При нея рискът от многоплодна бременност и хиперстимулационен синдром е много по-голям и затова обичайно се използва нискодозов режим.

Самостоятелното лечение с метформин е по-малко ефективно за лечение на инфертилитет при СПЯ, но комбинацията му с кломифен цитрат дава по-добри резултати, отколкото монотерапията с кломифен цитрат.

Асистиран репродуктивни технологии. Трета линия на лечение по отношение на инфертилитета са ин витро оплождане (in-vitro fertilisation (IVF) и интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоид (intracytoplasmic sperm injection (ICSI)). Успехът от лечението при жени със СПЯ е сходен с този при жени с друг вид репродуктивни проблеми [321].

Хирургични методи. Днес хирургичните методи за лечение на синдрома, включващи билатералната клиновидна резекция и лапароскопски овариален дрелинг, все по-рядко се използват, бивайки изместени от фармакологичните средства. Дрелингът има по-нисък риск от постоперативни усложнения като образуването на сраствания и затова той е по-предпочитаният метод от двата оперативни подхода [322, 323].

1.6. Заключение

Критичният поглед към направеното литературно проучване показва ясно, че СПЯ представлява все още предизвикателство както пред клинициста, така и пред съвременната приложна наука. От перспективата на практикуващия лекар са важни от една страна данните за високата му честота на разпространение и големия дял на недиагностицирани жени със СПЯ, а от друга страна - пъстрата и многолика клинична картина. Именно тези два факта подчертават необходимостта от неговото активно проучване сред жени както с ендокринологични и метаболитни проблеми, така и с

дерматологични, гинекологични и репродуктивни нарушения. Познаването на широката гама състояния в диференциално-диагностичен план ще позволи акуратното и своевременно диагностициране на синдрома.

В последните години световната общност определи някои ясни параметри за установяването на трите диагностични компонента на синдрома – хиперандрогенизъм, овулаторна дисфункция и поликистозна морфология на яйчниците. Въпреки това науката продължава да обследва диагностичния потенциал на някои нови биомаркери и да събира доказателства за други по-широко познати, като антимюлеровия хормон например. Допълнително наскоро се възобнови интереса към PSA в диагностиката на хиперандрогенизма при СПЯ.

Хирзутизмът е най-честият и специфичен клиничен белег на хиперандрогенизма. За българската популация обаче все още няма определена точна граница на mFG скор, която да диференцира нормалното от ексцесивното окосмяване в андрогензависимите зони при жената. Акнето и алопецията от своя страна изглежда, че имат по-скоро второстепенна роля в диагностиката на клиничния хиперандрогенизъм поради по-малката си честота на изява. Въпреки това интересни от клинична гледна точка са данните за дела на жените с всеки от тези три клинични показателя за хиперандрогенизъм.

Направеният литературен обзор показва, че фокусът на водещите изследователи в областта на СПЯ се измества върху клиничните последици от синдрома и чертае нови субгрупи, различни от четирите дефинирани фенотипа (А, В, С и D). Категорично СПЯ не се разглежда само като ендокринопатия, в която водещите проблеми са свързани с хирзутизма, менструалните нарушения и/или покистозата на яйчниците. Центърът на интерес е изместен към метаболитните последици от синдрома, потенциално повишения риск от нискостепенно възпаление и сърдечно-съдовия риск. Асоциацията на СПЯ с голям дял метаболитни заболявания събужда допълнително клиничния интерес и към друг вид метаболитно-асоциирани заболявания като остеоартрозата например. Безспорната връзка на СПЯ с ановулаторния инфертилитет у жените не би могъл да остане пренебрегнат и неочетен проблем от клинична гледна точка. В периферията на клиничния интерес

остават все още оценката на качеството на живот, сексуалната функция и психологическото благополучие на жената със СПЯ.

От гледна точка на изследователя предизвикателствата в търсене на точната патогенеза на СПЯ изглеждат като една своеобразна „кутия на пандора“. Предполагаемите патофизиологични механизми, залегнали в генезата на синдрома, непрекъснато се увеличават. Появяват се още нови и нови участници в сложния порочен кръг на СПЯ. Въпреки това ролята на инсулиновата резистентност и хиперинсулинемията продължават да заемат водещо място в тази сложна взаимовръзка. Ролята им се затвърждава допълнително и с откритията за висцералната мастна тъкан и секретиранията от тях адипокини. Още по-голям интерес събужда участието на скелетната мускулатура и миокините в този порочен цикъл, около които съществуват все още много неизвестни.

В търсене на това кой е първоизточникът на нарушенията при СПЯ се предполагат допълнително много външни фактори, генетични, невроендокринни, интраовариални и надбъбречни причини. Екзотика в това допълнително внася ендоканабиноидната система и предполагаемата роля на ендоканабиноидите както в метаболитните, така и в репродуктивните нарушения.

Безспорно съществува необходимост от натрупването на критично количество доказателства за утвърждаването на някои биохимични показатели и потвърждаване участието на други нови параметри. Познанието за ясните патофизиологични механизми при СПЯ ще позволи на клинициста да има възможността правилно и ефективно да лекува синдрома и свързаните с него нарушения.

В този смисъл настоящето изследване има за цел да направи комплексна клинична оценка на СПЯ и да анализира някои нови взаимовръзки с други заболявания и състояния, неизследвани в световната литература. Допълнително в научния труд се прави опит да се потвърдят някои известни факти, които за българската популация остават все още малко проучени, както и да се анализират нови биохимични маркери с цел постигането на по-задълбочен анализ на СПЯ в патофизиологичен аспект.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Набелязаните в обзора проблеми пораждат необходимостта от провеждане на задълбочени научни изследвания с цел обогатяване на познанията ни относно СПЯ както в клинична, така и в изследователска насока.

2.1. Цел

Целта на дисертационния труд е да се анализира връзката между нови биомаркери и утвърдени клинични, метаболитни и хормонални показатели при пациенти със СПЯ и здрави контроли.

2.2. Задачи

1. Да се извърши задълбочен анализ на пациентите със СПЯ по антропометрични и клинични показатели, включително и във фенотипните групи, и да се сравнят с данните от съответстващи им по възраст и индекс на телесна маса здрави контроли.
2. Да се оцени качеството на живот и сексуалната функция при жени със СПЯ, сравнени със здрави доброволци, включително и във фенотипните групи на синдрома.
3. Да се анализира взаимовръзката между СПЯ и остеоартроза, оценена посредством измерване на биомаркер за ранна хрущялна загуба (хрущялен олигомерен матриксен протеин [COMP]), ултразвуково изследване на двете коленни стави и въпросник Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) при пациенти със СПЯ и здрави доброволци.
4. Да се сравнят серумните нива на общ и свободен PSA между жени със СПЯ и здрави доброволци и да се оцени връзката им с клиничните и биохимични данни за хиперандрогенизъм.
5. Да се оцени връзката на ендоканабиноидите (AEA и 2-AG) с метаболитните и хормонални нарушения и най-често срещаните характеристики на синдрома като овулаторна дисфункция и поликистозна морфология на яйчниците при пациенти със СПЯ и здрави жени.

6. Да се изследват биомаркерите - зонулин, meteorin-like protein, IL-15, мионектин, brain-derived neurotrophic factor и IL-18, и оцени асоциацията им с метаболитните, хормонални и клинични нарушения при синдрома.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Пациенти и контроли

В настоящето срезово проучване са включени общо 161 жени, от които 124 жени със СПЯ и 37 здрави контроли. Пациентите са на средна възраст (mean \pm SD) – $26,9 \pm 6$ години, постъпили за хоспитализация в Клиниката по ендокринология на УМБАЛ „Александровска“, гр. София, или пациенти от доболничната ендокринологична помощ, потърсили самостоятелно или след препоръка от друг специалист (акушер-гинеколог, дерматолог) консултация с ендокринолог във връзка с кожни прояви, менструални нарушения, репродуктивни проблеми и др. Здравите доброволци в проучването са селектирани да съответстват по възраст и ИТМ на пациентите. Тяхната средна възраст е $28,4 \pm 5,5$ години. Всички участници са дали своето писмено информирано съгласие преди включване в проучването. Те отговарят на включващите и изключващите критерии, представени по-долу.

3.1.1. Включващи критерии за двете групи са жени:

- на възраст от 18 до 40 години,
- ИТМ между 18,5 и 40 кг/м².

3.1.1.1. Включващи критерии за пациентите със СПЯ

Включените пациенти в проучването изпълняват Ротердамските критерии на ESHRE/ASRM от 2004 г. [10] за поставяне на диагнозата СПЯ, т.е. наличие на 2 от следните 3 компонента. За дефиниране им са използвани международните препоръки за оценка и лечение на СПЯ на CREPCOS, разработен в колаборация с ESHRE и ASRM през 2018 г. [11]:

1. Хиперандрогенизъм:

- биохимичен (повишени нива на андрогените – тестостерон [≥ 1.6 nmol/L], FAI [≥ 5], DHEAS [≥ 9.2 mkmol/L], андростендион [≥ 3.1 ng/mL]) **и/или**
- клиничен (наличие на хирзутизъм с mFG score > 8 точки, акне или андрогенна алопеция).

2. Олиго-/ановулация:

- нередовен менструален цикъл < 21 или > 35 дни **и/или**
- < 8 менструални цикъла годишно **и/или**
- редовен менструален цикъл, но с данни за ановулация (оценена посредством овулаторен тест, измерване на прогестеронови нива 19-22 ден на менструалния цикъл или при ултразвуков преглед).

3. Ехографски белези за поликистозна морфология на яйчниците (достатъчно е измененията да засягат само единия яйчник):

- ≥ 10 мл обем при липса на ехографски данни за доминантен фоликул, жълто тяло или яйчникова киста **и/или**
- > 20 фоликула с диаметър 2-9 мм в яйчник.

3.1.1.2. Включващи критерии за здравите контроли са жени:

- без диагноза СПЯ,
- без друга причина за инфертилитет (с изключение на мъжки фактор).

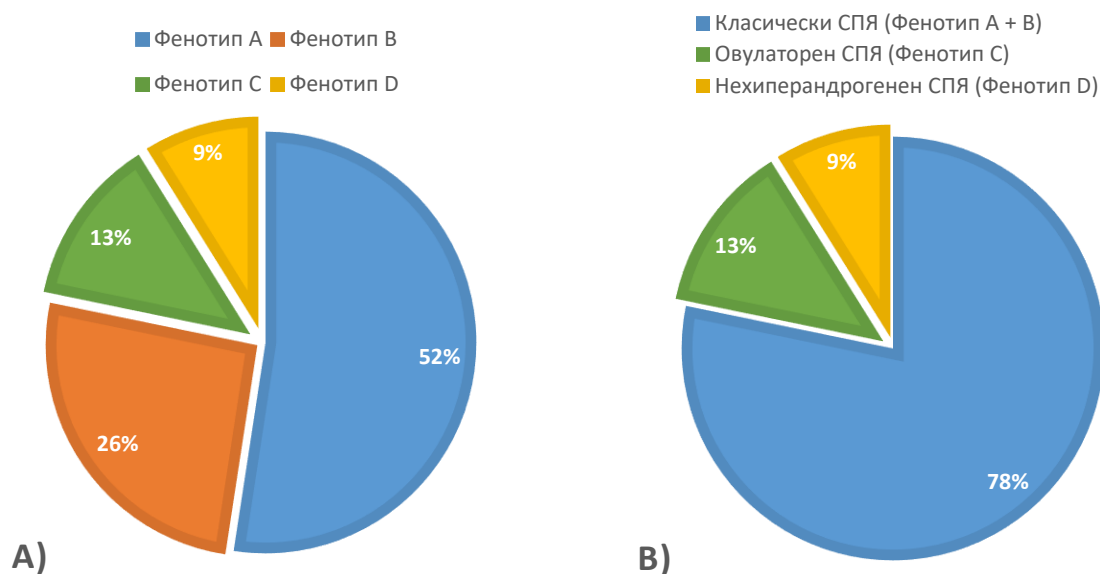
3.1.2. Изключващи критерии за двете групи

Изключващите критерии в проучването са: наличие на друго ендокринно нарушение като заболяване на щитовидната жлеза, хиперпролактинемия, преждевременна овариална недостатъчност, хипоталамична аменорея, вродена надбъбречна хиперплазия, андроген-продуциращ тумор, синдром или болест на Cushing, възпалително/автоимунно ревматично заболяване и/или белодробно заболяване. Участници, използващи системни кортикостероиди, комбинирани орални контрацептиви, антиандрогени или инсулинови очувствители (метформин, тиазолидиндиони) през последните 3 месеца, са изключени от изследването. Бременни и лактиращи жени, и професионални спортисти също не са обект на това проучване. Друг изключващ фактор е употребата на марихуана в последните 3 месеца.

3.1.3. Фенотипни групи при СПЯ

Съгласно Ротердамските критерии всички 124 пациенти са разделени в четири фенотипни групи, както следва:

1. **Фенотип А (n = 65)** - наличие и на трите диагностични компонента - биохимичен/клиничен хиперандрогенизъм, олиго-ановулация, поликистозна морфология на яйчниците.
2. **Фенотип В (n = 32)** - наличие на два от трите диагностични компонента - биохимичен/клиничен хиперандрогенизъм и олиго-ановулация, без поликистозна морфология на яйчниците.
3. **Фенотип С (n = 16)** - наличие на биохимичен/клиничен хиперандрогенизъм и поликистозна морфология на яйчниците, без олиго-ановулация.
4. **Фенотип D (n = 11)** - наличие на олиго-ановулация и поликистозна морфология на яйчниците, без биохимичен/клиничен хиперандрогенизъм.



Фигура 3.1. Процентно разпределение на 124 жени със СПЯ: А) в класическите 4 фенотипни групи – фенотип А (n = 65, 52%), В (n = 32, 26%), С (n = 16, 13%) и D (n = 11, 9%) и **В)** в класически СПЯ (фенотип А+В, [n = 97], 78%), овулаторен СПЯ (фенотип С, [n = 16], 13%) и нехиперандрогенен СПЯ (фенотип D, [n = 11], 9%)

3.2. Клинични методи

Всички участници в изследването – пациенти със СПЯ и здрави контроли, са подробно информирани за естеството на проучването, начина на обработване на

данните им, методите на изследване и целите, за които се събират. Всички участници подписаха информирано съгласие преди включване в изследването.

С цел улеснено обработване на първичната информацията се създаде електронна база данни в програмата Excel на Microsoft Office 2010, в която са отразени всички анамнестични, клинични, антропометрични и лабораторни данни.

3.2.1. Анамнестични данни

От всички участници в проучването е подробно снета следната анамнеза:

- **менструална** - възраст на менархе, продължителност на менструалния цикъл (между 21-35 дни; друг интервал), вариации в продължителността на цикъла, наличие на по-малко от 8 менструални цикъла годишно, дата на последната менструация, продължителност на менструалното кървене (< 3 дни; между 3-4 дни; между 5-6 дни или > 6 дни), прием на медикаменти за предизвикване на менструално кървене, провеждани тестове за оценка на овулацията, прием на медикаменти в последните 3 месеца.
- **репродуктивна** – анамнеза за бременности, раждания, извънматочни бременности, аборти; анамнестични данни инфертилитет в двойката (неуспешни опити за забременяване > 12 месеца); асистиран репродуктивни техники (IVF, ICSI) или провеждано лечение за индукция на овулацията; провеждани изследвания на партньора в насока инфертилитет (спермограма и други); наличие на данни за мъжки инфертилитет.
- **навици** - тютюнопушене, алкохол (> 30 мл концентрат или > 1 чаша вино (150 мл)/бира (330 мл)), употреба на марихуана или друг вид наркотик.

Всички 161 жени, включени в проучването, са помолени да попълнят въпросници, свързани с качеството на живот и сексуалната функция. На 80 жени (54 жени със СПЯ и 26 здрави контроли) от тях се раздаде допълнително и въпросник за оценка на колянна става сред млади и физически активни хора - Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS).

3.2.1.1. Въпросник за оценка на качество на живот

Въпросникът е специализиран и разработен насочено за оценка на качеството на живот сред жени със СПЯ – модифициран въпросник за оценка на качество на живот при синдром на поликистозни яйчници (Modified polycystic ovary syndrome health-related quality-of-life questionnaire, MPCOS-Q) [6, 91]. Въпросникът включва 30 въпроса, оценяващи качеството на живот в последните 2 седмици или в рамките на последната менструация, разпределени в 7 домейна:

- **емоционално нарушение** – въпроси № 2, 6, 11, 14, 17, 18, 24;
- **телесно тегло** – въпроси № 3, 4, 10, 12, 23, 25;
- **инфертилитет** – въпроси 5, 13, 26;
- **акне** - въпроси № 22, 27, 28, 30;
- **хирзутизъм** – въпроси № 1, 9, 15, 16, 29;
- **менструални симптоми** - въпроси № 7, 19, 21;
- **регулярност на менструацията** – въпроси № 8 и 20.

За всеки въпрос има 7 възможни опции за отговор. Опция 1 съответства на най-висока степен на нарушение, докато Опция 7 съответства на най-ниската степен на нарушение. Необходимо е да се избере само една от възможните опции за отговор на всеки въпрос. Избраната опцията следва да съответства в най-голяма степен на субективните усещания на анкетирания.

Оценка на въпросника се извършва по домейни, като резултатите от всеки отговор на въпрос в съответен домейн се сумират и след това техният сбор се разделя на броя на въпросите, включени в него. Полученият резултат се използва за последващия статистически анализ. Общият скор на въпросника се изчисли посредством сбора от точките във всеки домейн, разделен на броя домейни.

Резултатите от въпросника са сравнени между здрави и пациенти със СПЯ, при които допълнително се анализира връзката с анамнестичните, клиничните и антропометрични данни, включително и във фенотипните групи на синдрома.

3.2.1.2. Въпросник за оценка на сексуалната функция

Всички участници в проучването са помолени да попълнят специализиран въпросник за оценка на сексуалната функция – Индекс за сексуална функция при жени (Female Sexual Function Index, FSFI) [324]. Въпросникът съдържа 19 въпроса, свързани със сексуалните усещания и реакции на жената в 4 седмичния предшестващ период. Въпросите са разделени в 6 домейна:

- *желание* – въпроси № 1 и 2;
- *възбуда* – въпроси № 3, 4, 5, 6;
- *лубликация* – въпроси № 7, 8, 9, 10;
- *оргазъм* – въпроси № 11, 12, 13;
- *удовлетворение* – въпроси 14, 15, 16;
- *болка* – въпроси 17, 18 и 19.

За всеки въпрос има 6 възможни опции за отговор, с изключение на въпроси 1 и 2, където възможните опции за отговор са 5 (от 1 до 5). Опция 0 съответства на липса на сексуална активност в последните 4 седмици. Опция 1 съответства на най-висока степен на нарушение, докато опция 5 съответства на най-ниска степен на нарушение. Оценяването се извършва първо поотделно за всеки домейн, като сборът от резултатите на всеки въпрос се умножава по съответен коефициент и след това се изчислява общ скор, получен от сбора на резултатите във всички домейни. Минималният възможен общ скор съответства на 2 точки, а максималният на 36 точки. Сексуална дисфункция се приема при наличие на < 26 точки.

Резултатите от въпросника са сравнени между здрави и пациенти със СПЯ, включително и във фенотипните групи, при които допълнително се анализира връзката с клиничните и антропометрични данни и с резултатите от въпросника за оценка на качеството на живот.

3.2.1.3. Въпросник за оценка на ранни клинични прояви на колянна остеоартроза

Общо 80 жени – 54 пациента със СПЯ и 26 здрави контроли попълниха международно утвърден въпросник за оценка на симптоми и прояви, свързани с колянната става сред млади и физически активни хора - Knee Injury and Osteoarthritis

Outcome Score (KOOS). Чрез него се проведе оценка в двете изследвани групи на следните свързани с колянната става показатели: *болка, симптоми, качеството на живот, ежедневни дейности и спортна функция*. Въпросникът съдържа скала на Likert и всички елементи имат пет възможни опции за отговор, отбелязани от 0 (без проблеми) до 4 (екстремни проблеми) и всеки от петте резултата се изчислява като сума от включените елементи. Резултатите се трансформират в скала от 0 до 100, като нула съответства на най-тежките докладвани от пациента нарушения в коляното, а 100 съответства на липса на проблеми с коляното. Резултатите между 0 и 100 представляват процент от общия възможен постигнат резултат. Общият резултат не се изчислява, тъй като се счита за желателно да се анализират и интерпретират отделно петте домейна.

Резултатите от въпросника се сравняват между здрави и пациенти със СПЯ, при които допълнително се анализира връзката с клиничните и лабораторни характеристики на хиперандрогенизма при синдрома.

3.2.2. Антропометрични данни

На всички участници в проучването се извърши подробно антропометрично изследване, включващо следните параметри:

1. ръст (м),
2. тегло (кг),
3. индекс на телесна маса (ИТМ) - изчислен посредством теглото разделено на височината на квадрат ($\text{кг}/\text{м}^2$),
4. обиколка на талията (waist circumference, WC) - измерена в хоризонтална равнина по средата между върха на горния илиачен гребен и долния ръб на последното ребро в средноаксиларна линия в см,
5. обиколка на ханша (hip circumference, HC) – измерен на нивото на големия трохантер в см,
6. съотношение талия/ханш (waist-to-hip ratio, WHR) - изчислено като обиколката на талията се раздели на обиколката на ханша,
7. съотношение талия/ръст (waist-to-height ratio, WHtR) – изчислено като обиколката на талията се раздели на ръста.

Съгласно критериите на Световната Здравна организация (СЗО) наличие на затлъстяване се прие, че има при стойности на ИТМ ≥ 30 кг/м², наднормено тегло при ИТМ между 25 и 29,9 кг/м² и нормално тегло при ИТМ между 18,5 кг/м² и 24,9 кг/м² [325]. ИТМ е индикатор на генерализирано затлъстяване, който в по-малка степен позволява разграничаване между мастна и немастна тъкан [66, 326]. От своя страна антропометричните показатели - WC, WHR и WHtR, отразяват типа затлъстяване, с което позволяват разграничаването на централен (андроиден) тип от периферен (гиноиден) тип преразпределение на мастната тъкан и съответно свързаните с това повишен метаболитен и сърдечно-съдов риск [67, 68, 327, 328]. Централен (андроиден) тип мастно разпределение се определи при: WC ≥ 80 см, WHR $\geq 0,85$ или WHtR $\geq 0,5$ (50), а гиноиден тип съответно при WC < 80 см, WHR $< 0,85$ или WHtR $< 0,5$ (50) [329, 330].

3.2.3. Клинични данни

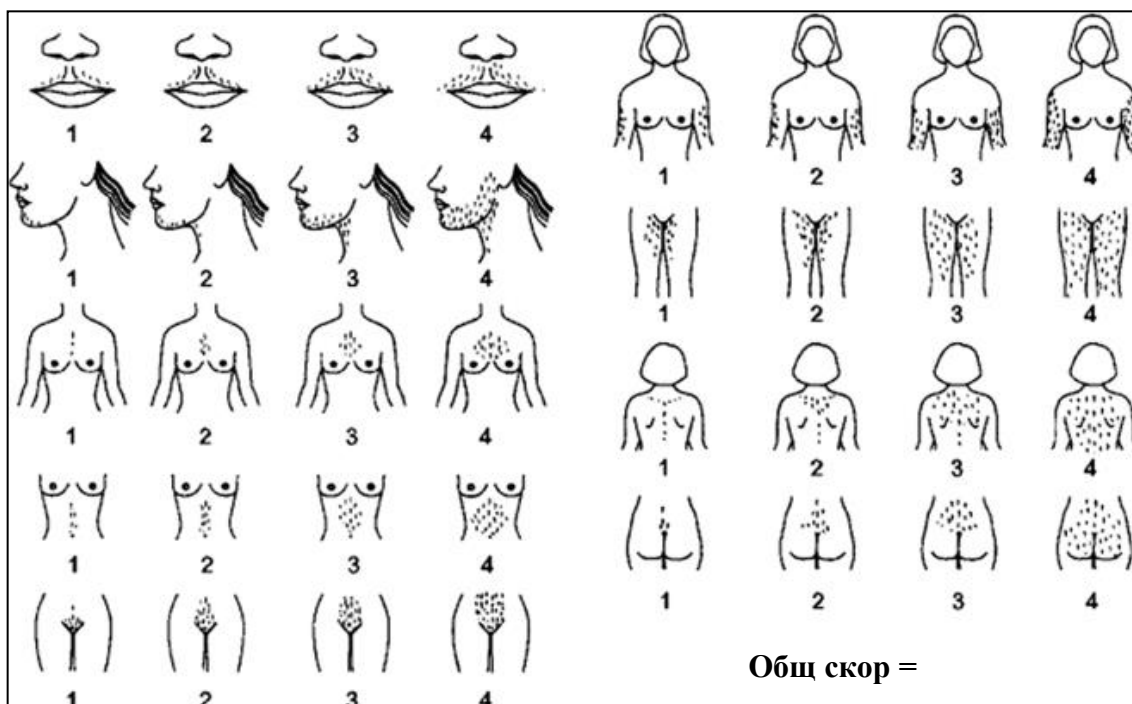
Всички участници в изследването са внимателно изследвани за наличие на белези за клиничен хиперандрогенизъм (хирзутизъм, акне, алопеция), acanthosis nigricans и им се измери артериалното налягане след поне 15 мин покой. Клиничната оценка се извърши съгласно алгоритъм, разписан в международните препоръки за оценка и лечение на СПЯ на CREPCOS в колаборация с ESHRE и ASRM през 2018г. [11].

3.2.3.1. Клиничен хиперандрогенизъм

Хирзутизъм. Оценка на белезите за хирзутизъм се извърши посредством модифицираната скала на Ferriman-Gallwey (mFG score) (**фигура 3.2.**) [19]. Скалата изследва признаците на ексцесивно окосмяне (поява на дълги > 5 мм, пигментирани, задебелени косми, наричани още терминални косми) в 9 андроген-зависими зони - горна устна, брадичка и шия, гърди (с изключение на зърната), горна и долна част на гърба, горна и долна част на корема, мишницата и вътрешната страна на бедрата по скала от 1 (минимално наличие на терминални косми) до 4 (наличие на терминални косми, подобни на тези при добре окосмен мъж) [18]. Липсата на терминални косми

в изследваната област се отбелязва с 0. Наличие на хирзутизъм се прие, че има при общ брой точки ≥ 8 [331].

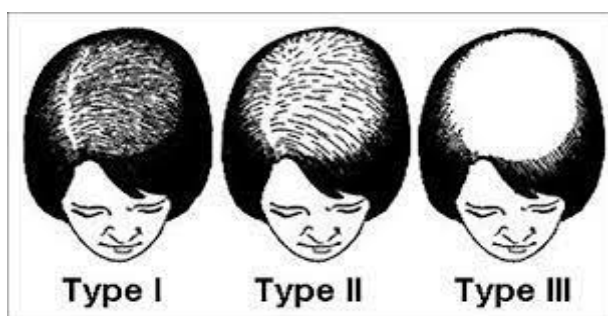
Акне. По отношение на акнето няма утвърден универсален инструмент за оценка. За целите на настоящето проучване клинични белези за акне се прие, че има при наличие на леко, умерено или тежко акне, класифирано съгласно Консенсусна конференция за класификация на акне (The Consensus Conference on Acne Classification [332]). Съгласно тази класификация леко акне има при наличие на комедони без белези за значително възпаление, умерено акне - при наличие на комедони, но с белези за възпалителни папули и пустули и тежко акне - при наличие на възпалителни нодули в допълнение към комедони, папули и пустули. В нашата база данни липсата на акне се отбелязва с 0, докато наличието му с 1, независимо от степента на проява.



Фигура 3.2. Модифицирана скала на Ferriman-Gallwey за оценка на хирзутизма в 9 андроген-зависими зони по скала от 0 (липса на терминални косми) до 4 (наличие на терминални косми, подобни на тези при добре окосмен мъж) [18]

Алопеция. Клинична оценка на андрогенната алопеция се извърши посредством визуалната скала на Ludwig. Съгласно нея има 3 степени за андрогенна

алопеция при жени: I степен - забележимо изтъняване на косъма на темето, отграничено фронтално с линия, разположена 1-3 см зад предната линия на косата (**фигура 3.3. Type I**); II степен - изразено изтъняване на косата на темето в областта, наблюдавана в степен I (**фигура 3.3. Type II**); III степен - пълно оплешивяване в областта, наблюдавана при I и II степен (**фигура 3.3. Type III**) [333].



Фигура 3.3. Визуална скала за оценка на андрогенна алопеция на Ludwig, илюстрираща 3 степени на оплешивяване при жени. I степен – забележимо изтъняване на косъма на темето, отграничено фронтално с линия на 1-3 см зад предната линия на косата; II степен – изразено изтъняване на косата на темето и III степен – пълно оплешивяване на същата област [333]

В обема от клинични изследвания на участниците се включи допълнително оценка наличието на acanthosis nigricans (AN) и измерване на артериалното налягане (АН). AN е кожен симптом, характеризиращ се със симетрично разположени кадифени, хиперпигментирани плаки върху зони, подложени на по-интензивно триене като аксилите, шия, под мамилите и слабините. Всички участници в проучването са изследвани за наличие на подобни кожни промени в изброените области и отразени с 0 при липса на AN и с 1 при наличие на данни за AN в базата данни.

Двукратно се измери АН на участниците след поне 15 минути покой по стандартен начин с мануален сфингоманомер, разположен на мишницата, на около 2 см над кубиталната ямка. Данни за артериална хипертонията се прие, че има при стойности на систолното артериално налягане в покой над 140 mmHg и/или стойности на диастолното АН над 90 mmHg [334].

3.3. Лабораторни методи

3.3.1. Рутинни биохимични и хормонални тестове

Посредством стандартна венепункция са взети кръвни проби от общо 106 участника в проучването по време на ранна фоликуларна фаза (между 3-ти и 5-ти ден) на спонтанен менструален цикъл или предизвикано от гестаген менструално кървене.

Всички жени са предварително помолени да не се хранят през нощта за период от 8 до 12 часа и да си починат 30 минути преди венепункцията. Пробите са незабавно обработени за измерване на плазмена глюкоза на гладно (ПГГ), серумен имунореактивен инсулин (ИРИ) на гладно, ЛХ, ФСХ, естрадиол, общ тестостерон, DHEAS и андростендион.

Допълнително при тях е проведен стандартен ОГТТ със 75 g глюкоза, разтворени в 250 ml вода и приети за период от 5 минути от участниците в изследването. В продължение на 2 часа те са помолени да останат в покой, като в този период двукратно им се взе кръв за повторно изследване на кръвна захар и ИРИ на 60 мин и 120 мин. Посредством резултатите от кръвната захар в mmol/l и инсулин на гладно в mU/l се изчисли хомеостатичния модел за оценка на инсулинова резистентност (НОМА-IR) чрез следната формула:

$$\text{НОМА-IR} = \text{Кръвна захар (mmol/l)} \times \text{Инсулин (mU/l)} / 22,5.$$

Данни за инсулинова резистентност се прие, че има при НОМА-IR > 2,5 и/или пикови нива на инсулин по време на ОГТТ > 100 IU/mL [126].

Свободният андрогенен индекс (FAI) се изчисли с помощта на математическа формула, която включва общите нива на тестостерон и SHBG съгласно следното уравнение: FAI = Тестостерон (nmol/L)/SHBG (nmol/L) x 100. Гранична стойност, диференцираща нормални от повишени нива на FAI, се прие да бъде 5 [25].

Всички тези хормонални и биохимични изследвания са извършени в Централната клиничната лаборатория на УМБАЛ „Александровска“, гр. София, която е референтна лаборатория за България.

Серумният инсулин се определи чрез използване на електрохемилюминесцентен имуноанализ (ECLIA – Roche Diagnostics™). Общият тестостерон и DHEAS са измерени по метода ECLIA от analytics Elecsys 2010 с аналитична чувствителност 0,069 nmol/L и 0,003 pmol/L, съответно. Референтните стойности за общия тестостерон са 0,29 – 1,67 nmol/L, а за DHEAS се движат между 1,7 и 9,2 pmol/L. Андростендион се измери чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), базиран на принципа на конкурентно свързване с аналитична чувствителност 0,019 ng/mL и референтни стойности между 0,75 и 3,1 ng/mL. Естрадиол, ЛХ и ФСХ са измерени чрез имунохемилюминесцентен тест с аналитична

чувствителност 29 pmol/L, 0,07 IU/l и 0,03 IU/l, съответно. Техните референтни стойности са съответно: между 45,4 и 854 pmol/L за естрадиол, между 2,4 и 12,6 IU/l за ЛХ и между 3,5 и 12,5 IU/l за ФСХ.

3.3.2. Нови биомаркери

Кръв за изследване на биомаркерите (АЕА, 2-AG, SHBG, IL-18, общ и свободен PSA, COMP, зонулин, meteorin-like protein, мионектин, IL-15 и BDNF) се взе във вакутейнер, съдържащ сепариращ гел, в деня на събиране на кръвните проби за биохимичните и хормонални изследвания при спазване на същите условия, описани по-горе. След престой от 30 мин на стайна температура за ретракция на съсирека, вакутейнерите са центрофугирани за 20 мин при 3000 rpm за отделяне на кръвен серум. С помощта на пластмасова пипета за еднократно ползване серумът се прехвърли в миниепруветки тип „Eppendorf“ при стриктно спазване на изискванията за отсъствие на хемолиза, липемия и иктер. Аликвотите са надлежно идентифицирани и съхранени при -80°C до извършване на анализа. Непосредствено преди всяка аналитична серия по една аликвота се размрази до стайна температура.

За определяне на всички биомаркери (АЕА, 2-AG, SHBG, IL-18, общ и свободен PSA, COMP, зонулин, meteorin-like protein, мионектин, IL-15 и BDNF) се използва ELISA метод. Спазени са всички условия за анализ, съгласно съответните характеристики на ELISA кита:

- **Хрущялен олигомерен матриксен протеин (COMP)** - BioVendor Laboratory Medicine, Modrice Czech Republic (Cat. No: RD194080200) с аналитична чувствителност на теста, равняваща се на 0,4 ng/mL
- **Общ простат-специфичен антиген (PSA)** - Abbexa Ltd., Cambridge, United Kingdom (Cat. No: abx350483) с референтни граници на теста (0,312 ng/ml-20 ng/ml) и чувствителност < 0,19 ng/mL
- **Свободен PSA** - Antibodies, Germany (Cat. No: ABIN625348) с референтни граници на теста - 45-12,000 pg/mL
- **2-arachidonoylglycerol (2-AG)** - Abbexa Ltd., Cambridge, United Kingdom (Cat. No: abx 258337) с чувствителност на теста < 1,44 ng/mL и референтни граници на кита – 3,7 ng/mL-300 ng/mL

- **Sex Hormone-binding Globulin (SHBG)** - DIAsource ImmunoAssays S.A., Louvain-la-Neuve, Belgium (Cat. No: KAPD 2996) с референтни граници на теста между 0,408-260 nmol/L
- **Anandamide (AEA)** - Abbeexa Ltd., Cambridge, United Kingdom (Cat. No: abx258779) с чувствителност на теста < 0,91 ng/mL и референтни граници между 2,47 ng/mL-200 ng/mL
- **IL-18** - Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Nagoya, Japan (code No: 7620) с аналитична чувствителност на теста, равняваща се на 12,5 pg/mL
- **Зонулин** – MyBiosource, Southern California, San Diego, USA (Cat.No MBS167049) с референтни граници на теста между 0,3 ng/ml-90 ng/ml и чувствителност – 0,13 ng/mL
- **Meteorin-like protein (Metrnl)** – MyBiosource, Southern California, San Diego, USA (Cat. No: MBS764456), референтни граници между 78-5000 pg/ml и чувствителност на теста < 46,9 pg/mL
- **Мионектин** - MyBiosource, San Diego, USA (Cat.No: MBS1600042), референтни граници между 0,05 ng/ml-10 ng/ml и чувствителност на теста, равняваща се на 0,03 ng/mL
- **IL-15** - Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria (Cat. No: BMS2106) с аналитична чувствителност на теста, равняваща се на 3,4 pg/mL
- **Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)** - MyBiosource, San Diego, USA (Cat.No: MBS264773) с референтни граници на теста между 31,2 pg/ml-2000 pg/ml и чувствителност, достигаща до 8 pg/mL

Резултатите на COMP, общ и свободен PSA и 2-AG са отчетени с помощта на ELISA отчитащо устройство Anthos Zenyth 3100 при 450 nm с референтен филтър 650 nm. Концентрациите са определени на базата на калибрационната крива в съответните за изследвания кит мерни единици.

Оптичната плътност на кладенчетата след спиране на ензимната реакция при изследванията на AEA, IL-18, SHBG, зонулин, Metrnl, мионектин, IL-15 и BDNF се записва с помощта на спектрофотометър Spark, Tecan, Австрия 450/630 nm. Последва

генериране на логистична крива, с помощта на която се изчисли концентрацията на изследваните биомаркери съгласно инструкциите на производителя и в съответните за всеки кит мерни единици.

3.4. Ултразвукова диагностика

3.4.1. Ултразвукова диагностика на яйчници

На всички участници в изследването се проведе трансвагинална ултразвукова диагностика (при *virgo intacta* – трансабдоминална) от акушер-гинеколог. Поликистозна морфология на яйчниците се потвърди при данни за обем на яйчниците ≥ 10 ml на един от двата яйчника без ехографски данни за жълто тяло, доминантен фоликул или кисти и/или при ехографски данни за наличие на > 20 фоликула с диаметър 2-9 мм в яйчник.

3.4.2. Ултразвукова диагностика на коленни стави

На случаен принцип от участниците са избрани 41 пациенти със СПЯ и 15 здрави доброволци, на които посредством ултразвуково изследване се определи дебелината на хрущяла на двете коленни стави. Ултразвуковото изследване се извърши на апарат Mindray Model Z5 с линейна сонда 75L38EA (5,0/7,5/10 MHz) от един сертифициран ревматолог с 8-годишен опит в мускулно-скелетната ехография, заслепен за клиничните характеристики на участниците. Дебелината на хрущяла се измери в средните точки на медиалния кондил (MC) и латералния кондил (LC) на всяко коляно в положение на пълна флексия.

3.5. Статистически анализ

Статистическите анализи са извършени с помощта на статистическите софтуерни продукти SPSS IBM v21.0 и GraphPad Prism v8.4. За изпълняване на поставената цел и задачи са използвани дескриптивна статистика, параметрични и непараметрични тестове, post-hoc анализ, множествен регресионен анализ и receiver operating characteristic (ROC) анализ.

Първоначално се проведе описателна статистика и разпределението на данните се оцени с тест на Shapiro–Wilk. Параметрични тестове (независим Т-тест и

корелация на Pearson) са използвани в случай на нормално разпределение на данните и по този начин хипотезите са изложени като разлика между средните стойности \pm стандартно отклонение ($\text{mean} \pm \text{SD}$).

В случай на негаусово разпределение данните са сравнени с непараметричния U-тест на Mann-Whitney. Тестът на Levene's за равенство на вариациите се извърши, за да се оцени хомогенността на дисперсията. Когато данните са разпределени по подобен начин, хипотезите са изложени по отношение на разликата между медианите (интерквартилен диапазон [IQR]). За оценка на корелациите на ненормално разпределените данни се използва корелационен анализ на Spearman (Rho). В анализа на дебелината на хрущяла на колянната става се използва частична корелация за контрол на ефекта на ИТМ. Тест на Kruskal-Wallis и Dunn-Bonferroni post-hoc анализи са използвани за сравняване на две и повече независими проби.

Множествен регресионен анализ с използване на „forward“ (вероятност за включване ≤ 0.98 , вероятност за изключване ≥ 0.99) и „enter“ методи за въвеждане на независими променливи са извършени за идентифициране на основните детерминанти на нивата на проучваните биомаркери сред изследваните променливи. Броят на включените участници в анализа на серумните нива на IL-18 се определи на базата на данни от предходни изследвания, измерващи нивата на проучваните биомаркери и посредством следния калкулатор: Sample Size Calculator Clinical Calc (<https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>). С цел постигане на алфа 0,05 и мощност $> 80\%$ на анализа, размерът на извадката се определи да бъде най-малко от 20 участника в група.

Проведе се ROC анализ, чрез който се определи чувствителността и специфичността на различни прагови стойности на mFG score и се оцени диагностичния потенциал на IL-15 в диагностиката на СПЯ. Посредством ROC анализа се изчисли чувствителността и специфичността на предложените прагови стойности за IL-15, диференциращи здрави от пациенти със СПЯ. Площта под кривата (AUC) се калкулира, в която стойности равни на 1 показват перфектна дискриминация.

Нивото на значимост за всички анализи се определи да е $p < 0,05$, при което нулевата хипотеза се отхвърля.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Демографски, антропометрични и клинични параметри при пациенти и контроли

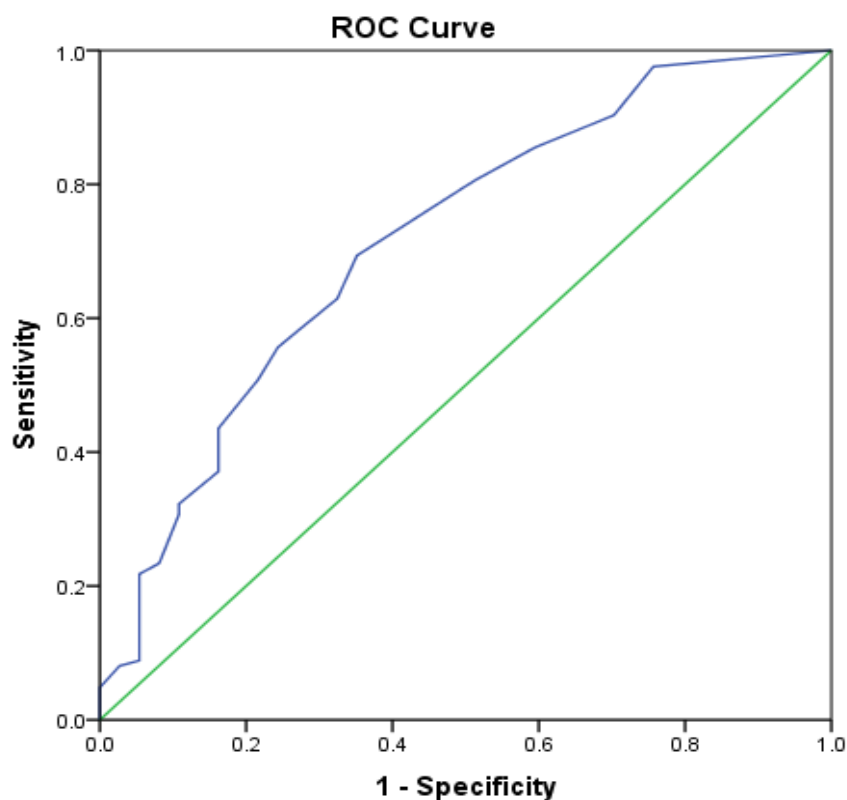
В настоящето срезово проучване са включени общо 161 жени, разпределени в две групи – 124 пациенти със СПЯ и 37 здрави контроли. Пациентите са на средна възраст (mean \pm SD) – $26,9 \pm 6$ години, докато средната възраст на контролната група е $28,4 \pm 5,5$ години. Пациентите и контролите показват сходство по отношение на ИТМ и всички изследвани антропометрични параметри (ръст, тегло, обиколка на талията и ханша, WHR и WHtR).

По отношение на изследваните клинични белези за хиперандрогенизъм - акне и алопеция, двете групи показват също сходство. Сред пациентите със СПЯ акне се установи при 22,6% (28/124) жени, докато при здравите жени акне се установи при 18,9% (7/37). Алопеция не се установи сред нито една от жените в контролната група. В пациентската група само 2 жени показват клинични признаци за алопеция, като и при двете тя съответства на I степен, оценена по визуалната скала на Ludwig. Макар да не се установи сигнификантна разлика по отношение клиничните белези за acanthosis nigricans (AN) ($p = 0,057$), пациентите със СПЯ показват тенденция към по-честа изява на този дерматологичен белег за хиперинсулинизъм и инсулинова резистентност. При нито един участник в изследването не се установи артериална хипертония.

Очаквано хирзутизмът, представен чрез mFG score, е сигнификантно по-висок в пациентската група ($p < 0,001$), като хирзутизъм се установи при 50,8% (63/124) от жените със СПЯ, докато в контролната група техният дял е 21,6% (8/37). Подобни са данните и по отношение на ехографските признаци за поликистозна морфология на яйчниците (ПКМЯ), където всички здрави жени са без ехографски белези за поликистоза и очаквано делът на пациентите с ПКМЯ е значимо по-голям ($p < 0,001$).

Проведе се receiver operating characteristic (ROC) анализ, за да се определи чувствителността и специфичността на стойностите на mFG score в нашия анализ. Площта под кривата (AUC) за серумните нива на mFG score е 0,717 с 95% доверителен

интервал от 0,621 до 0,813 (фигура 4.1). В таблица 4.1. са представени чувствителността и специфичността при съответните стойности на mFG score.



Diagonal segments are produced by ties.

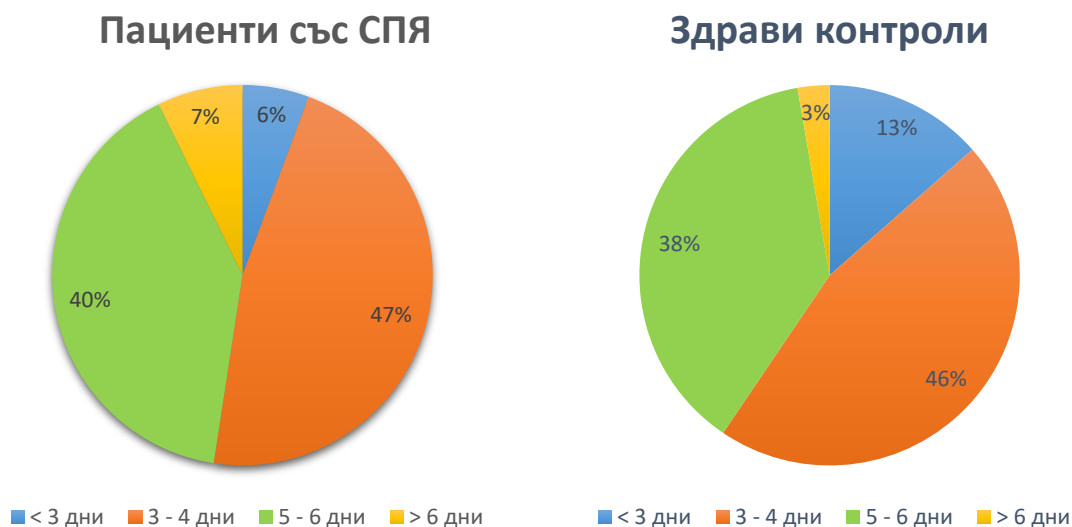
Фигура 4.1. ROC крива на стойностите на mFG score, дискриминиращи здрави от пациенти със СПЯ

Таблица 4.1. Чувствителност и специфичност на mFG score, получен посредством ROC анализ

mFG score	Чувствителност %	Специфичност %
3,5	80,6	48,6
4,5	69,4	64,9
5,5	62,9	67,6
6,5	55,6	75,7
7,5	50,8	78,4
8,5	43,5	83,8
9,5	37,1	83,8
10,5	32,3	89,2

mFG score – модифицирана скала на Ferriman-Gallwey

Менструалните нарушения по типа олиго-аменорея очаквано са сигнификантно по-изразени сред пациентите със СПЯ – 86,3% (107/124) жени. В контролната група менструални нарушения от този тип се установяват при 16,2% жени (6/37).



Фигура 4.2. Разпределение на дела на жените според средната продължителност на менструално кървене в двете изследвани групи – пациенти със СПЯ и контроли

При 63,6% (68/107) от жените с олиго-аменорея в пациентската група менструалните нарушения датират от менархе. Възрастта на настъпване на менархе сред двете групи е сходна: $12,4 \pm 1,7$ за жените със СПЯ и $12,4 \pm 1,5$ за контролната група. Също така и в двете групи делът на жените с продължителност на менструалното кървене между 3-4 дни е най-голям – 47% и 46%, съответно за пациенти и контроли (**фигура 4.2**).

Анамнеза за реализирана/и бременност/и в миналото има при 22 жени от групата на пациентите със СПЯ (17,7%), докато в контролната група този дял е сигнификантно по-голям (13 от общо 37 жени или 35,1%). При задълбочения анализ на гинекологичната анамнеза се установи, че при общо 10 от 22-те жени (45,5%) сред пациентите със СПЯ и реализирана бременност има предшестваща анамнеза за инфертилитет. При всяка една от тях е изключен мъжки фактор за инфертилитета. При 2 жени бременността е реализирана след провеждана терапия за индукция на

овулацията или с помощта на други асистиращи репродуктивни техники, докато при останалите 8 пациенти - бременността е настъпила спонтанно.

Независимо от анамнезата за наличие или не за реализирана бременност в миналото, анамнестични данни за инфертилитет в двойката се установи при 15 жени в групата пациенти със СПЯ (15/124; 12,1%) и при 5 здрави жени (5/37; 13,5%). И докато мъжкият фактор е причината за инфертилитета сред всички здрави доброволци, подобна информация има само при 1 жена от групата на пациентите.

По отношение на вредните навици двете групи не показват сигнификантна разлика. Процентът на пушачите сред жените със СПЯ е 36,3% (45/124), срещу 21,6% (8/37) при здравите контроли. Сравнително малък процент от жените в двете групи съобщават за употребата на алкохол, надвишаваща препоръчаните според НИН норми [335] от 1 питие/дневно и съответно 8,9% (11/124) за жените със СПЯ срещу 8,1% (3/37) за контролите. **Таблица 4.2.** представя данните от анализите на демографските, антропометрични, клинични и анамнестични параметри в двете изследвани групи.

Таблица 4.2. Сравнение по демографски, антропометрични и клинични параметри в двете изследвани групи - пациенти със СПЯ и здрави контроли

Параметър	Пациенти със СПЯ (n = 124)	Здрави контроли (n = 37)	p value
Демографски и антропометрични параметри			
Възраст (години)	26,9 ± 6	28,4 ± 5,5	NS
ИТМ (кг/м²)	28,1 ± 7,9	27,7 ± 7,4	NS
• Нормално тегло (18,5-24,9 кг/м²)%	43,6 (54/124)	46 (17/37)	NS
• Наднормено тегло (25-29,9 кг/м²)%	15,3 (19/124)	24,3 (9/37)	NS
• Затлъстяване (≥ 30 кг/м²)%	41,1 (51/124)	29,7 (11/37)	NS
Ръст (м)	1,64 ± 0,07	1,64 ± 0,06	NS
Тегло (кг)	75,8 ± 21,9	74,8 ± 21,5	NS
Обиколка на талията (WC)	89,7 ± 18,1	86,5 ± 16,4	NS
• < 80 см (%)	38,7 (48/124)	40,5 (15/37)	NS
• ≥ 80 см (%)	61,3 (76/124)	59,5 (22/37)	NS

Обиколка на ханша (НС) (см)	103,5 ± 12,8	103,7 ± 12,4	NS
WHR	0,87 ± 0,13	0,83 ± 0,11	NS
• < 0,85 (%)	55,6 (69/124)	64,9 (24/37)	NS
• ≥ 0,85 (%)	44,4 (55/124)	35,1 (13/37)	NS
WHtR	55 ± 11,7	52,8 ± 10,1	NS
• < 50 (%)	45,2 (56/124)	51,4 (19/37)	NS
• ≥ 50 (%)	54,8 (68/124)	48,6 (18/37)	NS

Клинични параметри

Acanthosis nigricans (%)	35,5 (44/124)	18,9 (7/37)	NS
mFG score	8 (4; 12)	4 (0,5; 6,5)	< 0,001
Акне (%)	22,6 (28/124)	18,9 (7/37)	NS
Алопеция (%)	1,6 (2/124)	0 (0/37)	NS
ПКМЯ (%)	74,2 (92/124)	0 (0/37)	< 0,001

Параметри, свързани с менструацията и фертилитета

Менархе (години)	12,4 ± 1,7	12,4 ± 1,5	NS
Олиго-аменорея (%)	86,3 (107/124)	16,2 (6/37)	< 0,001
Реализирана бременност (%)	17,7 (22/124)	35,1 (13/37)	0,024
Анамнеза за инфертилитет (%)	12,1 (15/124)	13,5 (5/37)	NS

Вредни навици

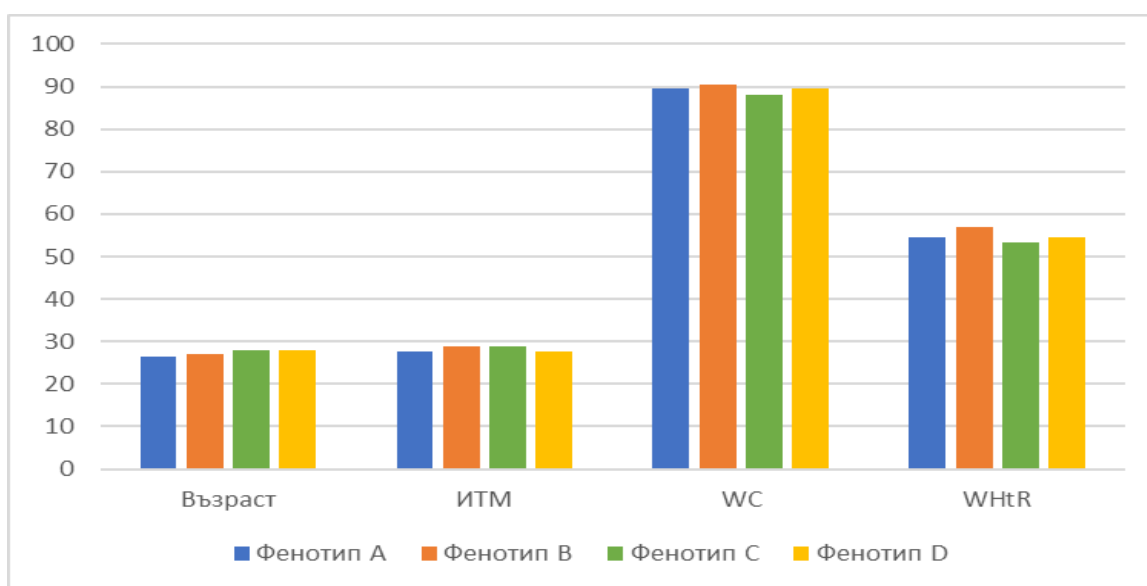
Пушачи (%)	36,3 (45/124)	21,6 (8/37)	NS
Употреба на алкохол (%)	8,9 (11/124)	8,1 (3/37)	NS
Употреба на наркотици (%)	0 (0/124)	0 (0/37)	NS

ИТМ – индекс на телесна маса; *ПКМЯ* – поликистозна морфология на яйчниците; *СПЯ* – синдром на поликистозни яйчници; *WHR* – отношение талия/ханси; *WHtR* – отношение талия/ръст; *mFG score* – модифицирана скала на Ferriman-Gallwey; *NS* – липса на сигнификантност. Нормално разпределение на данните, представено с mean (± SD).

Ненормално разпределение на данните, представено с median (интерквартилен размах [IQR]). Категорийните величини са представени като процент от общия брой – Chi-квадрат.

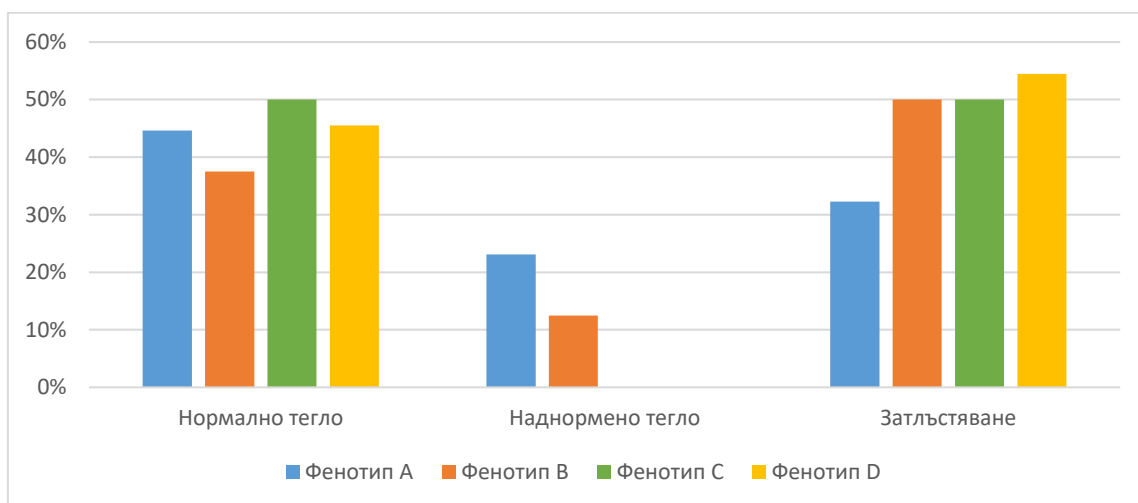
4.2. Анализ на демографските, антропометричните и клинични параметри във фенотипните групи на пациентите със СПЯ

Подробен анализ на демографските, антропометричните и клиничните параметри се извърши на пациентите по фенотипни групи. Четирите фенотипа на СПЯ (фенотип А, В, С и D) не показват сигнификантна разлика по нито един от изследваните антропометрични параметри и възрастта (**фигура 4.3**).



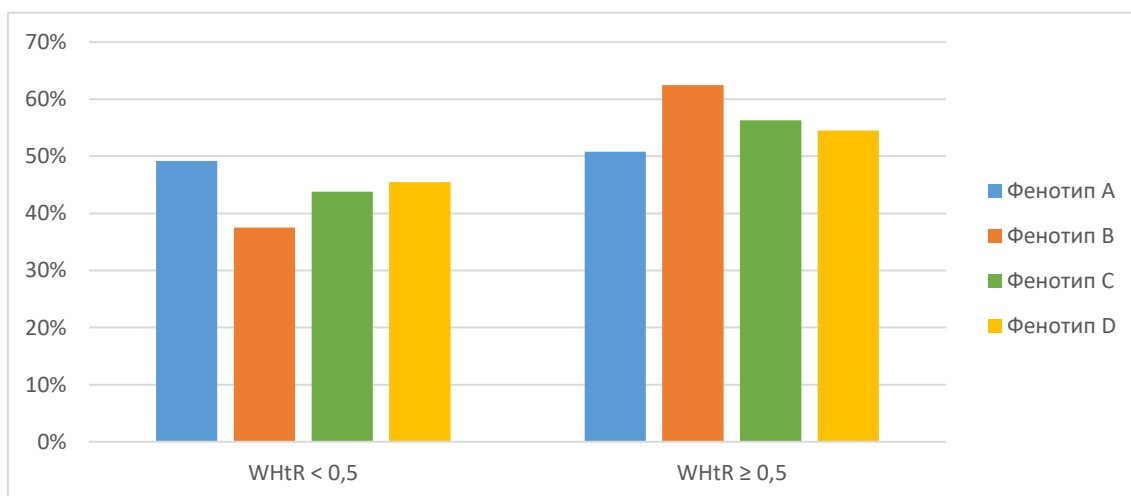
Фигура 4.3. Разпределение по възраст, индекс на телесна маса (ИТМ), обиколка на талията (WC) и талия/ръст отношение (WHtR), представени чрез средни стойности (mean) в четирите фенотипни групи на СПЯ

Процентното съотношение на жените с нормално тегло, наднормено тегло и затлъстяване във всеки фенотип е представено във **фигура 4.4**. Не се установява сигнификантна разлика между всеки фенотип. Най-голям дял на жените със затлъстяване се установява във фенотип D, докато пациенти с наднормено тегло има само във фенотип А и В.



Фигура 4.4. Процентно съотношение на жените с нормално тегло, наднормено тегло и затлъстяване във всеки фенотип

Във всеки фенотип лек превес има на дела на жените с висцерален тип преразпределение на мастната тъкан, оценен посредством WHtR (фигура 4.5).

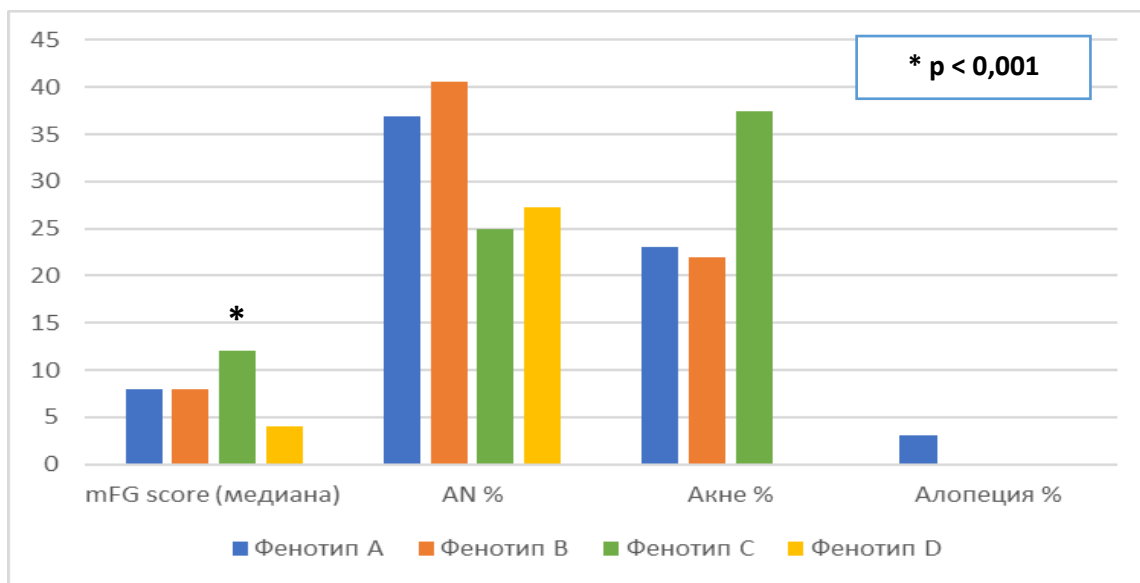


Фигура 4.5. Разпределение на жените според типа преразпределение на мастната тъкан в четирите фенотипа на СПЯ, оценен посредством WHtR (отношение талия/ръст)

По отношение на клиничните параметри интерес представлява анализът на данните от разпределението на клиничните признаци на хиперандрогенизъм в четирите фенотипни групи. Той показва, че медианата на mFG score е най-висока в групата на фенотип С - 12 (8,3; 20), докато във фенотип А тя е - 8 (4; 13), също така и във фенотип В - 8 (2; 11,8). Медианата за mFG score във фенотип D е 4 (2; 6).

Посредством Kruskal-Wallis тест и post-hoc анализ се определи, че сигнификантност при сравнението на mFG score има между фенотип А и D ($p = 0,023$), между фенотип А и С ($p = 0,032$), между фенотип С и В ($p = 0,004$) и между фенотип С и D ($p < 0,001$). Статистически значима разлика няма единствено между фенотип А и В, както и между фенотип В и D.

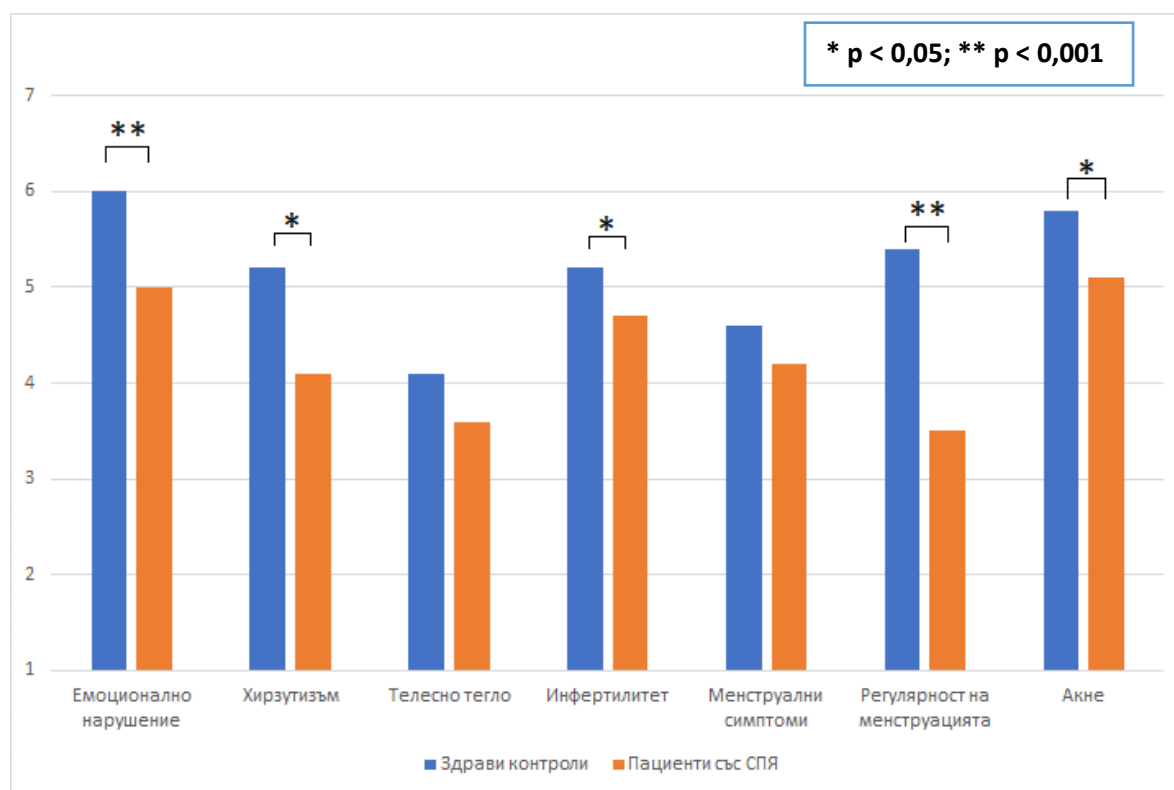
По отношение на AN, акне и алоpecia четирите фенотипа на СПЯ не показват сигнификантна разлика. AN се установи при 36,9% (24/65) жени, попадащи в категория фенотип А; фенотип В - 40,6% (13/32); фенотип С - 25% (4/16) и фенотип D - 27,3% (3/11). Акне се установи при 23,1% (15/65) жени с фенотип А; 21,9% (7/32) с фенотип В; 37,5% (6/16) с фенотип С и 0% с фенотип D. Данни за алоpecia се установи само при 2 жени, попадащи в категория фенотип А - 3,1% (фигура 4.6).



Фигура 4.6. Разпределение по mFG score, представен със съответната медиана за всяка група, acanthosis nigricans (AN), акне и алоpecia, представени в %, в четирите фенотипа на СПЯ

4.3. Оценка на качество на живот сред пациенти и контроли посредством модифициран въпросник за оценка на качеството на живот (MPCOS-Q) при жени със СПЯ и здрави контроли

Всички участници в проучването (124 жени със СПЯ и 37 здрави контроли) попълниха въпросник за оценка на качеството на живот (Modified Polycystic Ovary Syndrome health-related quality-of-life Questionnaire (MPCOS-Q)), състоящ се от 30 въпроса, разпределени в 7 домейна - емоционално нарушение; телесно тегло; инфертилитет; акне; хирзутизъм; менструални симптоми и регулярност на менструацията. Анализира се резултата от скората за всеки от домейните поотделно между двете групи (представени на **фигура 4.7**) и общия скор. Средната стойност (mean) на общия скор за пациентите със СПЯ е $4,3 \pm 1$ и сигнификантно по-ниска ($p < 0,001$) от средната стойност в здравата група ($5,2 \pm 1$).



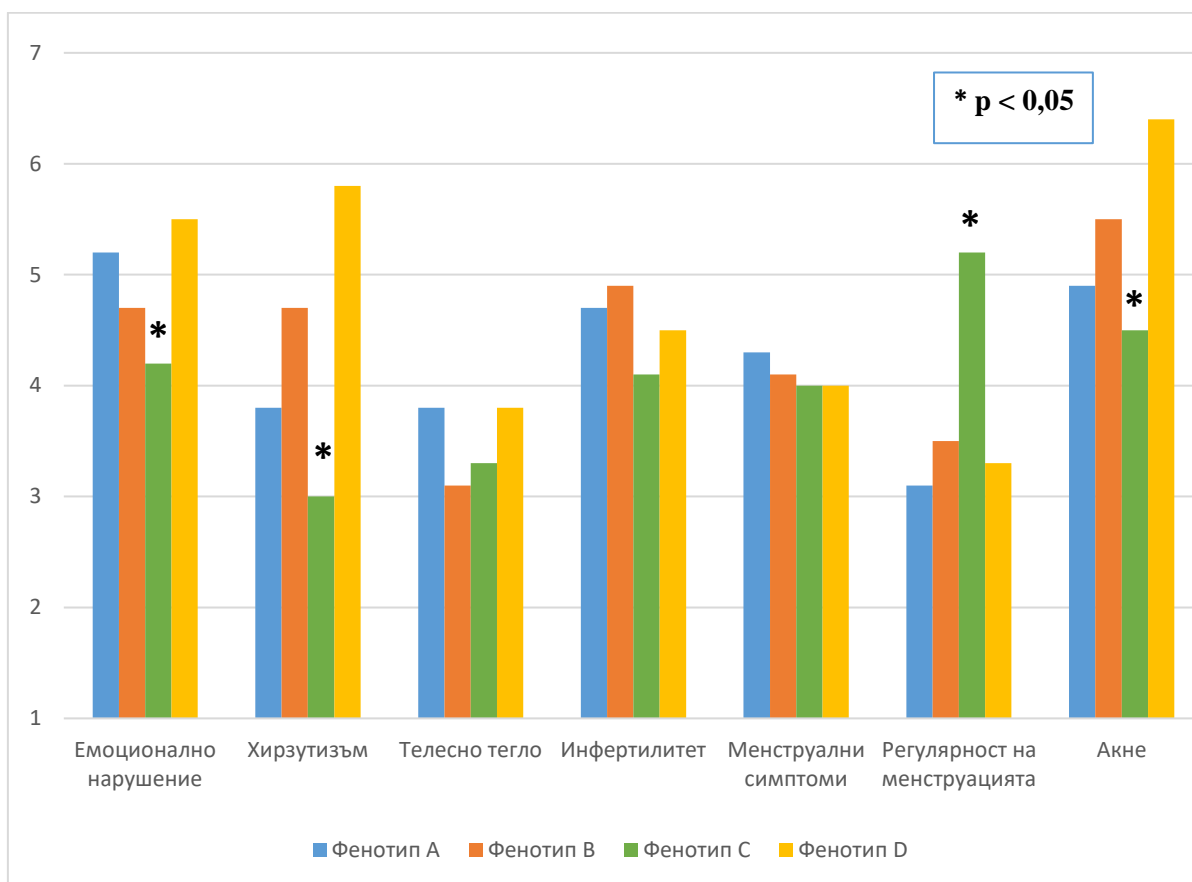
Фигура 4.7. Средни стойности на всеки от 7-те домейна на MPCOS-Q в двете групи – здрави контроли и пациенти със СПЯ

В анализа на домейните поотделно се показва, че в пет от домейните на MPCOS-Q пациентите имат сигнификатно по-ниска средна стойност на скората от контролите. В домейните *емоционално нарушение* и *регулярност на менструацията* тя достигна статистическа значимост ($p < 0,001$). В домейните *хирзутизъм*, *инфертилитет* и *акне* статистическата значимост е $p = 0,008$, $p = 0,044$ и $p = 0,043$, съответно. Само по отношение на домейните *телесно тегло* и *менструални симптоми* двете групи не се различават сигнификантно (**фигура 4.7**).

Корелационен анализ между възрастта, ИТМ, WHR, WHtR и mFG score от една страна и 7-те домейна на MPCOS-Q в групата на пациентите със СПЯ, представен в **таблица 4.3**, показва, че ИТМ и WHtR корелират сигнификантно с домейн *хирзутизъм*, *телесно тегло* и *акне*. WHR корелира негативно само с домейн *хирзутизъм* и *телесно тегло*. mFG score корелира негативно с 4 от домейните на MPCOS-Q – *емоционално нарушение*, *хирзутизъм*, *телесно тегло* и *инфертилитет*. Възрастта не показва сигнификантна корелация с нито един от домейните на въпросника.

4.3.1. Поданализ на резултатите от MPCOS-Q сред четирите фенотипа на СПЯ групата

От проведения Kruskal-Wallis тест, сравняващ резултатите от 7-те домейна на MPCOS-Q в четирите фенотипни групи на СПЯ (фенотип А, В, С и D), се установи статистически значима разлика в 4 от домейните – *емоционално нарушение*, *хирзутизъм*, *регулярност на менструацията* и *акне* между групите. **Фигура 4.8** представя сравнението между средните стойности на всеки домейн в четирите фенотипни групи и онаглеждава междугруповите разлики.



Фигура 4.8. Средни стойности на всеки от 7-те домейна на MPCOS-Q в четирите фенотипни групи на СПЯ – фенотип А, В, С и D

От post-hoc анализа става ясно, че по отношение на домейн *емоционално нарушение* фенотип С докладва най-голямо нарушение, което достига статистическа значимост само с фенотип А ($p = 0,048$). В домейн *хирзутизъм* статистическа значима разлика се наблюдава между фенотип А и D ($p = 0,015$); фенотип С и В ($p = 0,031$) и фенотип С и D ($p = 0,002$). По отношение на домейн *регулярност на менструацията* фенотип С докладва сигнификантно по-леко нарушение спрямо фенотип А ($p = 0,002$) и фенотип В ($p = 0,033$). В последния домейн *акне* post-hoc анализът показва сигнификантност между фенотип А и фенотип D ($p = 0,020$), както и между фенотип С и D ($p = 0,022$). В домейните *телесно тегло*, *инфертилитет* и *менструални симптоми* групите не показват сигнификантна разлика.

Таблица 4.3. Корелационен анализ между домейните от MPCOS-Q и параметрите – възраст, ИТМ, WHR, WHtR и mFG score сред пациенти със СПЯ

	Емоционално нарушение	Хирзутизъм	Телесно тегло	Инфертилитет	Менструални симптоми	Регулярност на менструацията	Акне
Възраст	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ИТМ	NS	r = -0,328 p < 0,001	r = -0,590 p < 0,001	NS	NS	NS	r = 0,243 p = 0,007
WHR	NS	r = -0,274 p = 0,002	r = -0,371 p < 0,001	NS	NS	NS	NS
WHtR	NS	r = -0,293 p = 0,001	r = -0,571 p < 0,001	NS	NS	NS	r = 0,222 p = 0,013
mFG score	r = -0,318 p < 0,001	r = -0,645 p < 0,001	r = -0,285 p = 0,001	r = -0,252 p = 0,005	NS	NS	NS

ИТМ – индекс на телесна маса; *WHR* – съотношение талия/хани; *WHtR* – съотношение талия/ръст; *mFG score* – модифицирана скала на Ferriman-Gallwey за оценка на хирзутизъм. *Pearson* и *Spearman* корелационен анализ (*Rho*) е използван за нормално и неправилно разпределените данни, респективно.

4.4. Оценка на сексуалната функция сред пациенти и контроли

Посредством въпросник - Индекс за сексуална функция при жени (Female Sexual Function Index, FSFI), се проведе оценка на сексуалната функция в двете групи. Както по отношение общия скор, така и в 6-те домейна поотделно (*желание, възбуда, лубрикация, оргазъм, удовлетворение* и *болка*), здрави и пациенти със СПЯ не показват сигнификантна разлика (таблица 4.4). Сексуална дисфункция (FSFI score < 26) се установи сред 42,7% (53/124) от пациентите със СПЯ и сред 45,9% (17/37) от здравите контроли.

Таблица 4.4. Средни стойности на FSFI въпросника по домейни и общ скор в двете изследвани групи – пациенти със СПЯ и здрави контроли

FSFI домейн	Пациенти със СПЯ (n = 124)	Здрави контроли (n = 37)	p value
Желание	3,4 ± 1,2	3,3 ± 1,1	NS
Възбуда	3,8 ± 2,1	3,8 ± 2,1	NS
Лубрикация	4,1 ± 2,4	4,4 ± 2,3	NS
Оргазъм	3,6 ± 2,3	3,9 ± 2,2	NS
Удовлетворение	4,3 ± 1,8	4,4 ± 1,8	NS
Болка	3,8 ± 2,5	3,9 ± 2,4	NS
Общ скор	23 ± 11,1	23,2 ± 10,7	NS

FSFI - Индекс за сексуална функция при жените, *СПЯ* – синдром на поликистозни яйчници; *NS* – липса на сигнификантност. Нормално разпределение на данните, представено с mean (± SD).

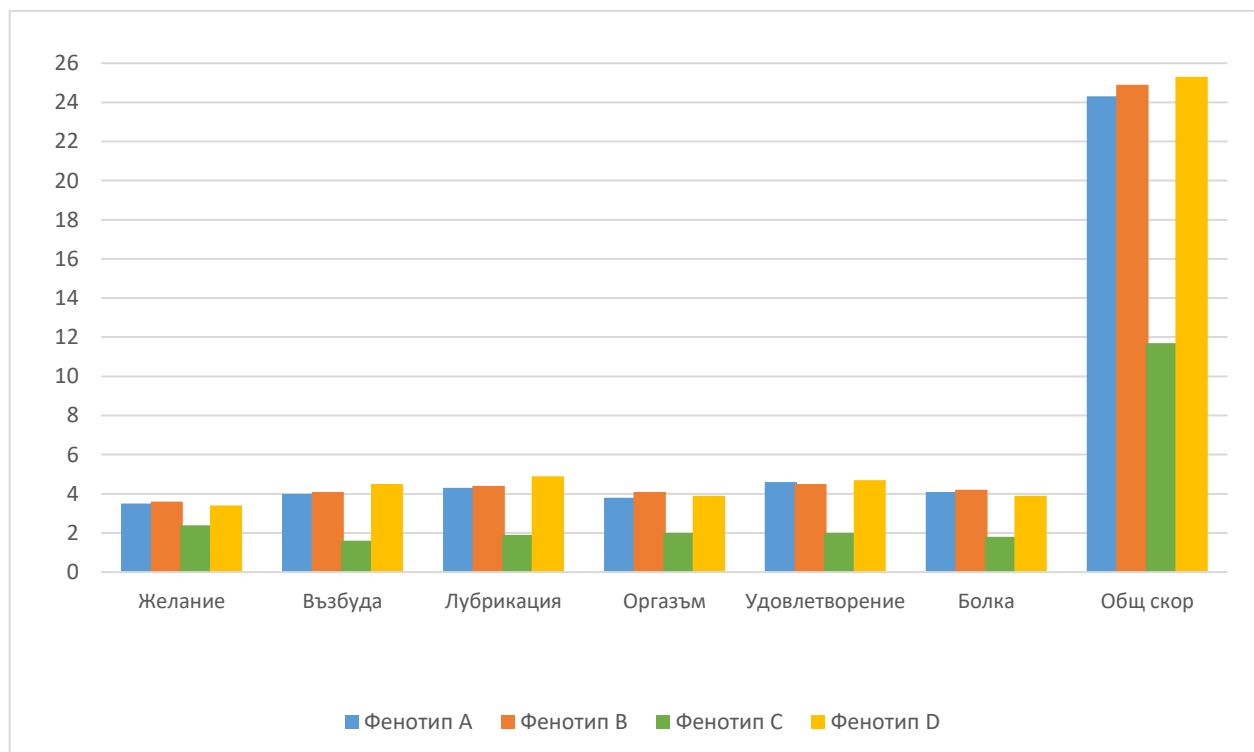
Проведе се корелационен анализ в групата на пациентите със СПЯ между 6-те домейна на FSFI въпросника и антропометричните, демографски и клинични параметри, както и домейните от MPCOS-Q, представени в таблица 4.5. Установи се положителна корелация между домейните *желание, лубрикация* и *болка* и ИТМ. Възрастта показва позитивна корелация единствено с домейн *болка*. WHR и WHtR не корелират сигнификантно с нито един домейн. mFG score показва негативна корелация с домейните *възбуда* и *удовлетворение*.

От корелационния анализ между домейните от FSFI и MPCOS-Q сигнификантна позитивна корелация се установи между *емоционалното нарушение* и всеки от 6-те домейна на FSFI. Домейн *хирзутизъм* от MPCOS-Q корелира

позитивно единствено с домейн *удовлетворение* от FSFI. Интересен е корелационният анализ между домейн *инфертилитет* на MPCOS-Q и FSFI домейните – позитивна корелация се наблюдава между всички домейни от въпросника за сексуалната функция, с изключение само на домейн *възбуда*. Негативна корелация между домейн *регулярност на менструация* от MPCOS-Q и домейн *удовлетворение* от FSFI се установи също. Домейн *акне* позитивно корелира с всеки от домейните на въпросника за сексуална функция, с изключение на домейн *желание* (таблица 4.5).

4.4.1. Поданализ на домейните от FSFI въпросника сред четирите фенотипа на СПЯ групата

От проведения Kruskal-Wallis тест, сравняващ резултатите от общия скор и от 6-те домейна поотделно на FSFI въпросника в четирите фенотипни групи на СПЯ (фенотип А, В, С и D), се установи статистически значима разлика както във всички домейни поотделно, така и в общия скор, онагледена чрез **фигура 4.9**.



Фигура 4.9. Сравнение между средните стойности на всеки домейн и общия скор на FSFI въпросника сред четирите фенотипни групи на СПЯ

Post-hoc анализът показва, че по отношение на домейн *желание* фенотип С показва най-изразено нарушение, което остана сигнификантно спрямо резултатите при фенотип А ($p = 0,002$) и фенотип В ($p = 0,004$). По отношение на домейн *възбуда* резултатът е аналогичен, но тук сигнификантност се наблюдава между фенотип С и всеки от останалите три фенотипа – фенотип А, В и D ($p = 0,002$; $0,003$; $0,017$, съответно). В домейн *лубликация* анализът показва подобен резултат – сигнификантността отново е между фенотип С и фенотип А, В и D ($p = 0,001$; $0,003$; $0,017$, съответно). В домейн *оргазъм* се достигна сигнификантност само между фенотип С и D ($p = 0,018$). По отношение на домейн *удовлетворение* post-hoc анализът показва сигнификантност между фенотип С и всеки от трите фенотипа – фенотип А, В и D ($p < 0,001$; $< 0,001$ и $0,015$, съответно). В домейн *болка* фенотип С отново показва най-ниски стойности, като те сигнификантно се различават от фенотип А и В ($p = 0,011$ и $p = 0,010$, съответно). Post-hoc анализът на резултатите от *общия скор* посочва сигнификантна разлика между фенотип С и трите останали фенотипа А, В и D ($p = 0,001$; $0,001$ и $0,024$, съответно).

Таблица 4.5. Корелационен анализ между домейните на FSFI, възрастта, ИТМ, WHR, WHtR, mFG score и домейните от MPCOS-Q сред пациентите със СПЯ

Параметри	Желание	Възбуда	Лубрикация	Оргазъм	Удовлетворение	Болка
<i>Антропометрични, демографски и клинични параметри</i>						
Възраст	NS	NS	NS	NS	NS	r = 0,248 p = 0,006
ИТМ	r = 0,176 p = 0,051	NS	r = 0,210 p = 0,019	NS	NS	r = 0,190 p = 0,035
WHR	NS	NS	NS	NS	NS	NS
WHtR	NS	NS	NS	NS	NS	NS
mFG score	NS	r = -0,206 p = 0,021	NS	NS	r = -0,278 p = 0,002	NS
<i>Домейни на MPCOS-Q</i>						
Емоционално нарушение	r = 0,188 p = 0,036	r = 0,286 p = 0,001	r = 0,333 p < 0,001	r = 0,354 p < 0,001	r = 0,332 p < 0,001	r = 0,351 p < 0,001
Хирзутизъм	NS	NS	NS	NS	r = 0,221 p = 0,014	NS
Телесно тегло	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Инфертилитет	r = 0,179 p = 0,047	NS	r = 0,249 p = 0,005	r = 0,262 p = 0,003	r = 0,260 p = 0,003	r = 0,277 p = 0,002
Менструални симптоми	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Регулярност на менструацията	NS	NS	NS	NS	r = -0,239 p = 0,008	NS
Акне	NS	r = 0,332 p < 0,001	r = 0,303 p = 0,001	r = 0,324 p < 0,001	r = 0,307 p = 0,001	r = 0,296 p = 0,001

ИТМ – индекс на телесна маса; *СПЯ* – синдром на поликистозни яйчници; *mFG score* – модифицирана скала на Ferriman-Gallwey за оценка на хирзутизъм; *MPCOS-Q* – модифициран въпросник за оценка на качество на живот при жени със синдром на поликистозни яйчници; *NS* – липса на сигнификантност; *FSFI* – индекс за сексуална функция при жени; *WHR* – съотношение талия/хани; *WHtR* – съотношение талия/ръст. Pearson и Spearman корелационен анализ (Rho) е използван за нормално и неправилно разпределените данни, респективно.

4.5. Хиперандрогенизъм при СПЯ – изследване на връзката му с клинични и серумни маркери за ранна хрущялна загуба и с общи и свободни нива на PSA

В проучванията са включени 80 жени – 54 пациенти със СПЯ и 26 здрави контроли. За целите на изследванията включените пациенти със СПЯ са само от фенотип А, В и С, при които клиничният и/или биохимичният хиперандрогенизъм е задължителен диагностичен критерий. Хиперандрогенизмът е потвърден при наличие на клинични характеристики (mFG score ≥ 8 , акне и/или алопеция) и/или повишени нива на андрогените (общ тестостерон $\geq 1,6$ nmol/L] и/или FAI ≥ 5) [25].

4.5.1. СПЯ и (пре)остеоартроза: оценка на връзката между хиперандрогенизма и серумните нива на хрущялен олигомерен матриксен протеин (COMP) като ранен маркер за хрущялна загуба

Проучването има за цел да анализира връзката между СПЯ и остеоартроза (ОА) чрез откриване на ранните симптоми на колянна ОА, ехографско измерване на дебелината на хрущяла на двете коленни стави и анализиране на серумния COMP (sCOMP) като ранен биомаркер за хрущялна загуба при пациенти със СПЯ и здрави доброволци. Анализира се допълнително връзката между клиничните и лабораторни характеристики на хиперандрогенизма със симптоматика, съотнасяща се към колянната става оценена чрез Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) въпросник, дебелината на хрущяла и sCOMP при пациенти със СПЯ.

Резултатите от проучването показват, че жените със СПЯ и контролите не се различават значимо по възраст и антропометрични показатели като ръст, тегло, ИТМ, WC и WHR. Хирзутизмът е значително по-изразен сред пациентите със СПЯ спрямо здравите контроли, оценен чрез mFG score ($p = 0,001$), докато двете групи не се различават значимо по отношение наличието на акне и алопеция. Групата със СПЯ има по-високи нива на общ тестостерон, DHEAS, андростендион (всяко $p < 0,001$), FAI ($p = 0,002$) и повишено съотношение ЛХ/ФСХ ($p = 0,035$). Съответните демографски, антропометрични, клинични, биохимични и хормонални характеристики на пациентите със СПЯ и контролите са представени в **таблица 4.6**.

Таблица 4.6. Демографски, антропометрични, клинични, биохимични и хормонални характеристики на пациентите със СПЯ и здравите контроли

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

ИТМ – индекс на телесна маса; ЛХ – лутеинизиращ хормон; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; ФСХ – фоликулостимулиращ хормон; DHEAS - дехидроепиандростерон сулфат; FAI – свободен андрогенен индекс; HC – обиколка на ханша; mFG score – модифицирана скала на Ferriman Gallwey; SHBG – секс-хормон свързващ глобулин; WHR – отношение талия/хани; WC – обиколка на талията. Нормално разпределените данни са представени посредством mean (± SD). Неправилно разпределените данни са представени посредством median (IQR). Категорийните величини са представени като пропорция от общия брой (n/N).

4.5.1.1. Сравнения на показатели, свързани с коляното, между пациенти със СПЯ и здрави контроли

Жените със СПЯ и здравите доброволци показват сходни резултати при оценяване на отделните домейни на KOOS въпросника - **болки в коляното**, свързано с коляното **качество на живот (QoL)** и **спорт и почивка**. Пациентската група показва, че има по-изразени **симптоми**, свързани с коляното, отколкото контролната група ($p = 0,035$). **Ежедневните дейности, свързани с коляното (ADL)**, са по-нарушени сред пациентите спрямо контролите ($p = 0,001$). Серумните нива на COMP са сходни и в двете проучвани групи. **Таблица 4.7.** показва стойностите и сравненията на изследваните параметри, свързани с коляното между СПЯ пациенти и здрави контроли.

Таблица 4.7. Сравнения на показатели, свързани с коляното, между пациенти със СПЯ и здрави контроли

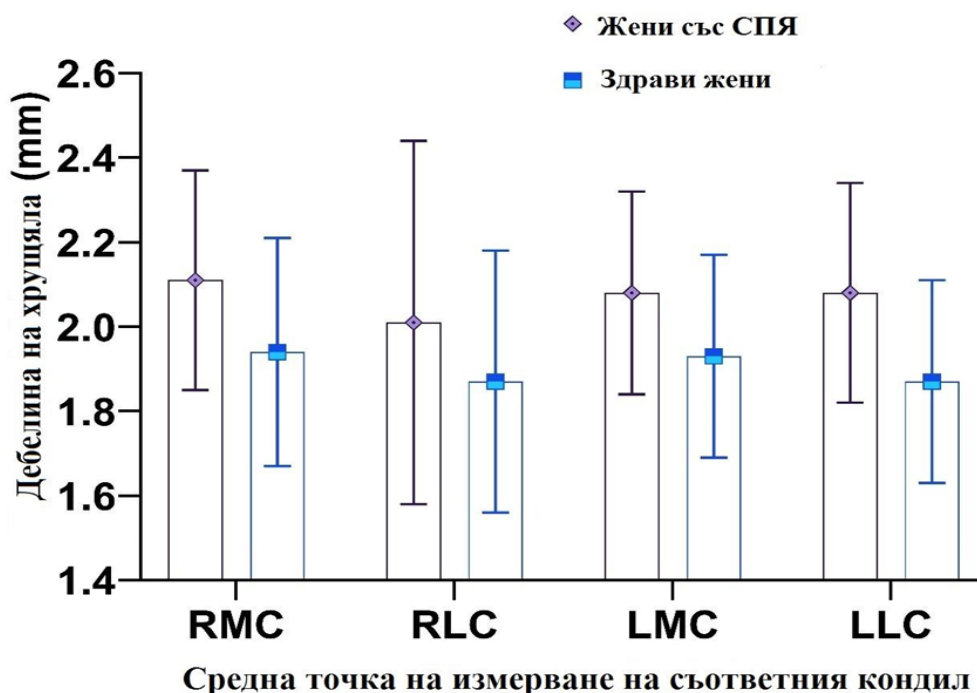
Параметри	Жени със СПЯ (n = 54)	Здрави жени (n = 26)	p value
KOOS болка	97,5 (92; 100)	100 (97; 100)	NS
KOOS симптоми	96 (85; 100)	100 (93; 100)	0,035
KOOS QoL	98 (79; 100)	100 (95; 100)	NS
KOOS ADL	92,5 (76; 98)	100 (97; 100)	0,001
KOOS спорт и почивка	89 (77; 100)	96,5 (80; 100)	NS
sCOMP (ng/mL)	464,1 (331,7; 644,8)	434,2 (372,3; 546,2)	NS

СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; ADL - ежедневни дейности, sCOMP – серумни нива на хрущялен олигомерен матриксен протеин, KOOS - Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score, QoL - качество на живот. Неправилно разпределение на данните, представени като median (IQR).

Ултразвуковите измервания показват, че феморалният хрущял на левия медиален кондил (МС) и латерален кондил (LC) и десния МС са значително по-дебели сред СПЯ пациентите ($n = 41$), отколкото в контролната група ($n = 15$) ($p = 0,05$, $p = 0,006$ и $p = 0,036$, съответно), както е показано на **фигура 4.10**.

4.5.1.2. Корелации между измерванията, свързани с коляното, и особеностите на хиперандрогенизма при пациенти със СПЯ

Всеки от петте домейна на KOOS (*болка, симптоми, QoL, ADL, спорт и почивка*) не корелират значимо с нито един от тестваните хормонални и клинични параметри на хиперандрогенизма. Дебелината на хрущяла на LC на дясното коляно корелира сигнификантно с FAI ($r = 0,31$, $p = 0,049$). След корекция по отношение на ИТМ, корелацията се загуби. Дебелината на хрущяла на другите изследвани места не показва корелация с особеностите на хиперандрогенизма. sCOMP корелира значимо и отрицателно с нивата на общия тестостерон ($r = -0,297$, $p = 0,029$) при жени със СПЯ, като корелацията остана значима и след контролиране на ИТМ.



Фигура 4.10. Сравнение между ултразвуковите данни за дебелина на хрущяла, представен като средна точка на измерване на съответен кондил, между жени със СПЯ ($n = 41$) и здрави контроли ($n = 15$) *LMC* - ляв медиален кондил, *LLC* - ляв латерален кондил, *RMC* - десен медиален кондил, *RLC* - десен латерален кондил

4.5.2. Общ и свободен PSA в диагностиката на хиперандрогенизма при СПЯ

Анализът на серумните нива на общ и свободен PSA сред жени със СПЯ има за цел да сравни нивата им с тези при здрави доброволци и да оцени връзката им с клиничните и биохимични данни за хиперандрогенизъм в пациентската група.

Жените със СПЯ очаквано са със сигнификантно по-изразен хирзутизъм спрямо здравите контроли ($p = 0,001$), докато акнето и алоpeciaята са сходно представени в двете групи. По отношение на хормоналните показатели групата със СПЯ също показва по-високи нива на общ тестостерон, DHEAS, андростендион (всяко $p < 0,001$), FAI ($p = 0,002$) и повишено съотношение ЛХ/ФСХ ($p = 0,035$). Серумните нива на общ и свободен PSA в двете групи - пациенти със СПЯ и здрави контроли, не показват сигнификантна разлика (4,49 [2,3; 7,1] срещу 4,18 [2,9; 7,3] ng/mL, $p > 0,05$ за общия PSA и 7,56 [0,5; 94,7] срещу 6,97 [0,5; 66,6] pg/mL, $p > 0,05$ за свободния PSA, съответно).

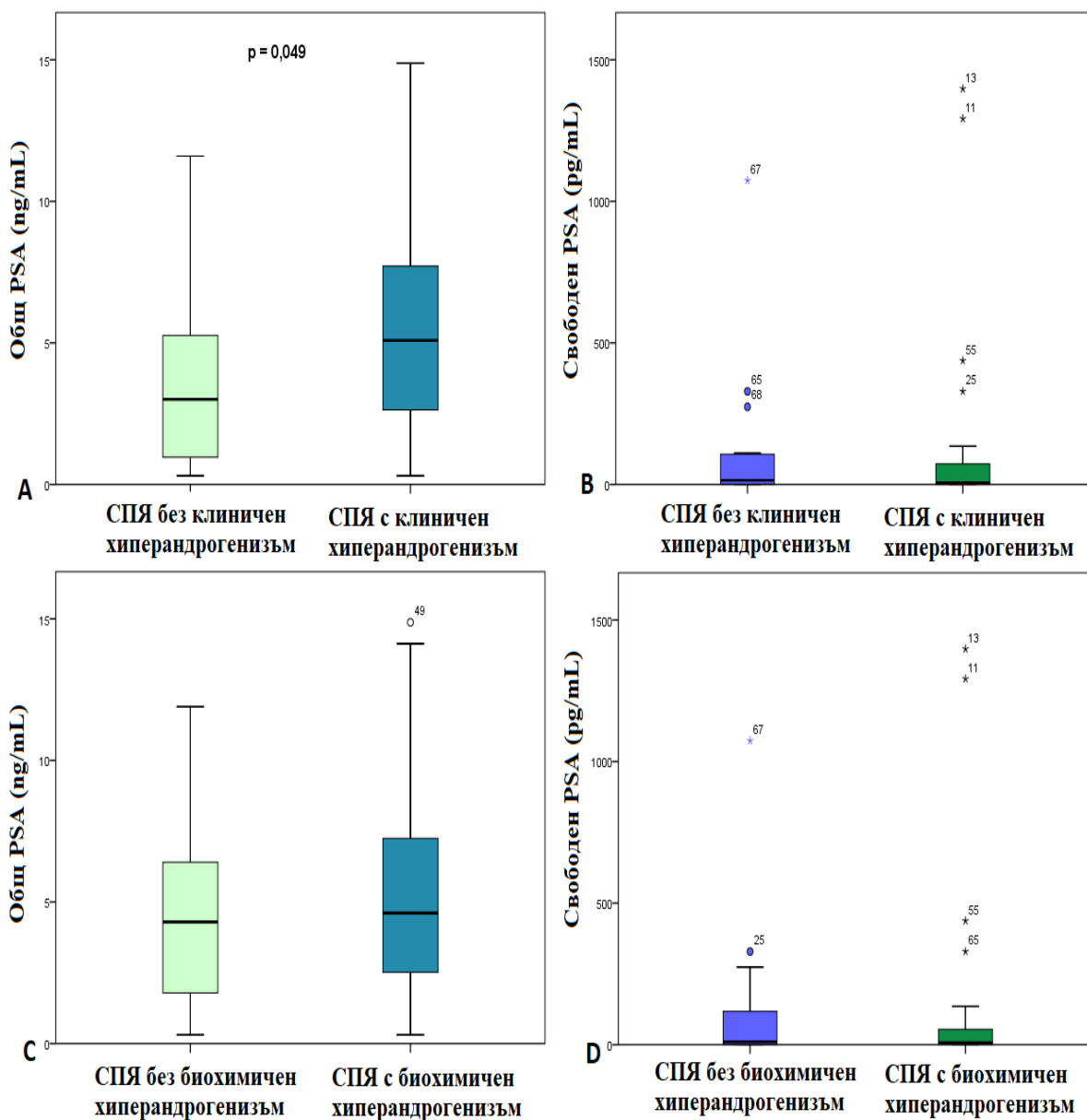
4.5.2.1. Корелации между серумните нива на общ и свободен PSA и особеностите на хиперандрогенизма при пациентите със СПЯ

Общият PSA показва сигнификантна положителна корелация с mFG score ($r = 0,305$, $p = 0,025$) и с нивата на ИРИ на 120 минута ($r = 0,310$, $p = 0,022$), докато свободният PSA не корелира с нито един от изследваните показатели.

4.5.2.2. Поданализ на серумните нива на общ и свободен PSA в СПЯ групата според критериите - клиничния/биохимичен хиперандрогенизъм

За да оценим по-точно връзката на общия и свободен PSA с клиничното или биохимично представяне на хиперандрогенизма при СПЯ са проведени допълнително 2 поданализа в пациентската група. В първия поданализ СПЯ групата ($n = 54$) се раздели на две подгрупи според клинични белези за хиперандрогенизъм (mFG score ≥ 8 и/или наличие на акне и/или алоpeciaята) на: СПЯ с клиничен хиперандрогенизъм ($n = 38$) и СПЯ без клиничен хиперандрогенизъм ($n = 16$). Във втория поданализ пациентите са разделили според биохимичните данни за хиперандрогенизъм (общ тестостерон $\geq 1,6$ nmol/L] и/или FAI ≥ 5) на 2 подгрупи:

СПЯ с биохимичен хиперандрогенизъм ($n = 35$) и СПЯ без биохимичен хиперандрогенизъм ($n = 19$). Проведеният анализ установи сигнификантна разлика в нивата на общ PSA само в първия поданализ, сравняващ според клиничните белези за хиперандрогенизъм. Пациентите с клиничен хиперандрогенизъм имат сигнификантно по-високи нива на общ PSA от жените без клинични белези за хиперандрогенизъм (5,1 [2,6; 7,8] срещу 3,7 [0,7; 5,3], $p = 0,049$). Във втория поданализ се установи, че общият PSA не показва сигнификантна разлика. Нивата на свободния PSA остават сходни между изследваните участници във всеки от двата поданализа (фигура 4.11).



Фигура 4.11. Сравнение на нивата на общ и свободен PSA в СПЯ подгрупите: **А)** Сравнение на нивата на общ PSA между СПЯ с/без клиничен хиперандрогенизъм ($n = 38$ срещу $n = 16$, съответно); **Б)** Сравнение на нивата на свободен PSA между СПЯ с/без клиничен хиперандрогенизъм ($n = 38$ срещу $n = 16$, съответно); **С)** Сравнение на нивата на общ PSA между СПЯ с/без биохимичен хиперандрогенизъм ($n = 35$ срещу $n = 19$, съответно); **Д)** Сравнение на нивата на свободен PSA между СПЯ с/без биохимичен хиперандрогенизъм ($n = 35$ срещу $n = 19$, съответно). *СПЯ* – синдром на поликистозни яйчници; *PSA* – простат-специфичен антиген

4.6. Роля на ендоканабиноидната система в метаболитните и хормоналните нарушения при СПЯ

4.6.1. Анализ на серумните нива на ендоканабиноида - анандамид и SHBG сред пациенти със СПЯ и изследване на връзката му с метаболитните и хормонални параметри

В проучването са включени 88 жени - 58 пациенти със СПЯ ($25,9 \pm 5,2$ години) и 30 здрави контроли ($27,6 \pm 5,2$ години). Целта на изследването е да се анализира връзката между анандамида (AEA), като основен лиганд на ендоканабиноидната система, с метаболитните и хормоналните нарушения при жени със СПЯ. Допълнително се анализират серумните нива на SHBG в двете групи и асоциацията им с антропометричните и метаболитни параметри сред тях.

Пациентите и здравите контроли не се различават сигнификантно по възраст, ИТМ и другите антропометрични показатели (тегло, ръст, талия, ханш, WHR и WHtR). Сред изследваните клинични показатели като acanthosis nigricans и акне не се установи статистическа значима разлика. Такава е налице по отношение на хирзутизма ($p < 0,001$). Наличие на алоpecia като клиничен показател за хиперандрогенизъм се констатира само при един пациент със СПЯ. По отношение на метаболитните показатели (ПГГ, ПГ 60 минута и ПГ 120 минута, ИРИ на 0, 60 и 120 минута и НОМА-IR) групите също не показват статистически значима разлика. Основните демографски и антропометрични характеристики на групите са представени в **таблици 4.8. и 4.9.**

4.6.1.1. Хормонални параметри и изследване на нивата на SHBG и AEA в групите

Пациентите и здравите контроли не показват статистически значима разлика по отношение на ЛХ, ФСХ, естрадиол, SHBG и AEA. Такава е налице по отношение на нивата на общия тестостерон, FAI, DHEAS, андростендион, както и при ЛХ/ФСХ отношението. Нивата на AEA, SHBG и хормоналните данни на двете изследвани групи са представени в **таблица 4.10.**

Таблица 4.8. Антропометрични характеристики на групите

Параметър	Жени със СПЯ (n = 58)	Здрави контроли (n = 30)	p value
Възраст (години)	25,9 ± 5,2	27,6 ± 5,2	NS
ИТМ (кг/м ²)	27,7 ± 7,3	29,3 ± 7,4	NS
Тегло (кг)	73,0 (58,0; 87,0)	70,0 (59,5; 97,3)	NS
Ръст (м)	1,64 (1,60; 1,68)	1,65 (1,60; 1,69)	NS
WC (см)	83,5 (76; 101,3)	84 (74; 96,8)	NS
НС (см)	100,5 (92; 110)	102 (92,8; 110,3)	NS
WHR	0,84 (0,77; 0,96)	0,81 (0,76; 0,90)	NS
WHiR	50,4 (45,3; 63,6)	48,7 (44,9; 57,4)	NS

ИТМ – индекс на телесна маса; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; НС – обиколка на ханши; NS – липса на сигнификантност; WC – обиколка на талията; WHR – талия/ханши отношение; WHiR – талия/ръст отношение. Нормално разпределение на данните, представено с mean (± SD). Неправилно разпределение на данните, представено с median (интерквартилен размах [IQR]).

Таблица 4.9. Клинични и метаболитни характеристики на групите

Параметър	Жени със СПЯ (n = 58)	Здрави контроли (n = 30)	p value
Acanthosis nigricans	36,2% (21/58)	20% (6/30)	NS
Акне	24,1% (14/58)	20% (6/30)	NS
mFG score	8 (4; 14)	3,5 (1; 6,3)	< 0,001
ПГГ (mmol/L)	5,0 (4,8; 5,3)	5,05(4,8; 5,2)	NS
ПГ 60 мин (mmol/L)	6,7 (5; 8,8)	6,8 (5,1; 8)	NS
ПГ 120 мин (mmol/L)	5,5 (4,8; 6,5)	5,5 (4,8; 6,3)	NS
ИРИ 0 мин (mU/L)	9,4 (5,9; 16,8)	9,3 (6,0; 14,4)	NS
ИРИ 60 мин (mU/L)	80,7 (46,1; 127,5)	61,9 (30,9; 124,3)	NS
ИРИ 120 мин (mU/L)	42,3 (23,4; 85)	30,1 (17,2; 49)	NS
НОМА-IR	2,15 (1,25; 3,74)	2,18 (1,28; 3,27)	NS

ИРИ – имунореактивен инсулин; ПГГ – плазмена глюкоза на гладно; ПГ – плазмена глюкоза; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; НОМА-IR – хомеостатичен индекс за оценка на инсулинова резистентност; mFG score – модифицирана скала на Ferriman-Gallwey. Неправилно разпределение на данните, представено с median (интерквартилен размах [IQR]). Категорийните величини са представени като процент от общия брой – Chi-квадрат.

Таблица 4.10. Хормонални и биохимични характеристики на групите

Параметри	Жени със СПЯ (n = 58)	Здрави контроли (n = 30)	p value
ЛХ (mU/mL)	6,6 (4,7; 8,5)	5,8 (4,1; 8,1)	NS
ФСХ (mU/mL)	5,1 (4,3; 6,1)	5,5 (4,8; 6,5)	NS
ЛХ/ФСХ отношение	1,2 (1,0; 1,8)	1,0 (0,8; 1,2)	0,023
Естрадиол (pmol/L)	133,7 (96,9; 193,8)	147,2 (104,8; 190,3)	NS
Тестостерон (nmol/L)	1,6 (1,1; 2,0)	0,9 (0,7; 1,1)	< 0,001
DHEAS (µmol/L)	8,9 (6,5; 11,6)	5,5 (4,2; 7,5)	< 0,001
Андростендион (ng/mL)	4,4 (3,0; 5,5)	2,3 (1,5; 2,7)	< 0,001
FAI	3,4 (1,7; 6,8)	1,5 (1,0; 3,1)	0,002
SHBG (nmol/L)	45,1 (28,6; 79,1)	54,0 (28,3; 80,5)	NS
АЕА (ng/mL)	3,8 (2,0; 6,8)	3,4 (2,1; 8,4)	NS

ЛХ – лутеинизиращ хормон; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; ФСХ – фоликулостимулиращ хормон; АЕА – анандамид; DHEAS - дихидроетиаандростендион сулфат; FAI – свободен андрогенен индекс; mFG score – модифицирана скала на Ferriman-Gallwey; SHBG – секс-хормон свързващ глобулин. Ненормално разпределение на данните, представено с median (интерквартилен размах [IQR]).

4.6.1.2. Корелационен анализ между нивата на АЕА и SHBG, хормоналните и метаболитните параметри в СПЯ групата

- **АЕА**

Анализира се връзката между нивата на АЕА с нивата на метаболитните и хормоналните показатели при пациентите със СПЯ. Установи се сигнификантна негативна корелация между нивата на ендоканабиноида с кръвната захар на 120 минута ($r = -0,304$, $p = 0,020$) и WHR ($r = -0,266$, $p = 0,044$). С останалите метаболитни и хормонални показатели корелации не се установяват.

- **SHBG**

При корелационен анализ между нивата на SHBG и антропометричните, метаболитните и хормоналните показатели при СПЯ се установи негативна корелация между него и повечето от изследваните антропометрични и метаболитни показатели, представени в **таблица 4.11**. С останалите изследвани хормонални показатели, включително и с нивата на АЕА, корелация не се установи.

Таблица 4.11. Корелационен анализ между SHBG, антропометричните и метаболитни показатели в СПЯ групата

Параметри	SHBG	
	Корелационен коефициент (r)	p value
ИТМ (кг/м ²)	-0,590	< 0,001
Тегло (кг)	-0,513	< 0,001
НС (см)	-0,413	0,001
WC (см)	-0,570	< 0,001
WHR	-0,524	< 0,001
ИРИ на 120 мин (mU/L)	-0,487	< 0,001
ПГ на 120 мин (mmol/L)	-0,405	0,002
ИРИ на 0 мин (mU/L)	-0,377	0,004
НОМА-IR	-0,362	0,005
mFG score	-0,323	0,013

ИРИ – имунореактивен инсулин; ИТМ – индекс на телесна маса; ПГ – плазмена глюкоза; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; НС – обиколка на ханша; НОМА-IR – хомеостатичен индекс за оценка на инсулинова резистентност; mFG score – модифицирана скала на Ferriman-Gallwey; SHBG – секс-хормон свързващ глобулин; WC – обиколка на талията; WHR – съотношение талия към ханш. Pearson и Spearman корелационен анализ (Rho) е използван за правилно и неправилно разпределените данни, респективно.

4.6.1.3. Поданализ на пациентите със СПЯ спрямо техния ИТМ

При разделяне на пациентската група според техния ИТМ на група със затлъстяване (ИТМ \geq 30 кг/м²; n = 24) и група без затлъстяване (ИТМ < 30 кг/м²; n = 34) се проведе анализ на изследваните параметри, представени в **таблицы 4.12., 4.13. и 4.14.**

Пациентките със СПЯ и затлъстяване са със сигнификантно по-високо тегло, талия, ханш и WHR спрямо групата СПЯ без затлъстяване. При почти всички метаболитни показатели се установи статистически значима разлика, с изключение само на кръвна захар на гладно (p = 0,338). Сред хормоналните и биохимичните показатели сигнификантна разлика е налице в нивата на ЛХ (p = 0,048), ЛХ/ФСХ отношението (p = 0,011), SHBG (p < 0,001) и FAI (p < 0,001). Налице и статистическа значима разлика по отношение на хирзутизма (p = 0,001) и acanthosis nigricans (p = 0,017). АЕА не показва сигнификантна разлика в двете изследвани групи – СПЯ със затлъстяване и СПЯ без затлъстяване.

Таблица 4.12. Антропометрични и клинични характеристики на пациентите със и без затлъстяване

Параметър	СПЯ със затлъстяване (n = 24)	СПЯ без затлъстяване (n = 34)	p value
Тегло (кг)	90,5 (81,3; 100,4)	60 (55,9; 66,3)	< 0,001
WC (см)	104,0 (96; 116,8)	77,0 (71,8; 81)	< 0,001
НС (см)	111 (102,5; 119,8)	96 (91; 100)	< 0,001
WHR	0,97 (0,85; 1,03)	0,79 (0,77; 0,84)	< 0,001
Acanthosis nigricans	54,2% (13/24)	23,5% (8/34)	0,017
mFG score	11 (8; 16)	5 (3; 10)	0,001
Акне	20,8% (5/24)	26,5% (9/34)	NS
Олиго-аменорея	83,3% (20/24)	97,1% (33/34)	NS
ПКМЯ	87,5% (21/24)	88,2% (30/34)	NS

ПКМЯ – поликистозна морфология на яйчниците; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; mFG score – модифицирана скала на Ferriman-Gallwey; WC – обиколка на талията; WHR – талия/ханти отношение. Неправилно разпределение на данните, представено с median (интерквартилен размах [IQR]). Категорийните величини са представени като процент от общия брой – Chi-квадрат.

Таблица 4.13. Метаболитни характеристики на пациентите със и без затлъстяване

Параметър	СПЯ със затлъстяване (n = 24)	СПЯ без затлъстяване (n = 34)	p value
ПГГ (mmol/L)	5 (4,8; 5,6)	5 (4,7; 5,2)	NS
ПГ 120 мин (mmol/L)	5,8 (5,3; 7,1)	5,1 (4,2; 6)	0,003
ИРИ 0 мин (mU/L)	14,5 (9,7; 22,9)	6,4 (4,8; 10,4)	< 0,001
ИРИ 120 мин (mU/L)	75,5 (41; 138,4)	32,3 (21,2; 49,7)	0,001
НОМА-IR	3,31 (2,36; 5,44)	1,38 (1,02; 2,5)	< 0,001

ИРИ – имунореактивен инсулин; ПГГ – плазмена глюкоза на гладно; ПГ – плазмена глюкоза; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; НОМА-IR – хомеостатичен индекс за оценка на инсулинова резистентност. Неправилно разпределение на данните, представено с median (интерквартилен размах [IQR]).

Таблица 4.14. Хормонални и биохимични характеристики на пациентите със и без затлъстяване

Параметър	СПЯ със затлъстяване (n = 24)	СПЯ без затлъстяване (n = 34)	p value
ЛХ (mU/mL)	5,5 (4; 7,9)	7 (5,1; 9,3)	0,048
ФСХ (mU/mL)	5,1 (4,7; 6,2)	5,1 (4,3; 5,9)	NS
ЛХ/ФСХ отношение	1,1 (0,8; 1,4)	1,5 (1,1; 2,1)	0,011
Естрадиол (pmol/L)	131,9 (113,4; 187,6)	133,8 (89,5; 215,8)	NS
Тестостерон (nmol/L)	1,6 (1,3; 2)	1,5 (1,1; 2,1)	NS
DHEAS (mkmol/L)	9,9 (7,5; 11,5)	7,7 (6,4; 11,6)	NS
Андростендион (ng/mL)	4,1 (3; 5,5)	4,5 (3,5; 5,5)	NS
FAI	6,7 (3,4; 9,6)	2,4 (1,1; 3,6)	< 0,001
SHBG (nmol/L)	29,3 (18; 43)	54 (34,5; 103,9)	< 0,001
AEA (ng/mL)	3,1 (2; 6,1)	4,3 (1,9; 7,4)	NS

ЛХ – лутеинизиращ хормон; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; ФСХ – фоликулостимулиращ хормон; AEA – анандамид; DHEAS - дихидроепиандростендион сулфат; FAI – свободен андрогенен индекс; SHBG – секс-хормон свързващ глобулин. Неправилно разпределение на данните, представено с median (интерквартилен размах [IQR]).

4.6.2.4. Поданализ на пациентите със СПЯ спрямо WHR

При разделяне на пациентската група спрямо WHR на група с андроиден тип преразпределение на мастната тъкан ($WHR \geq 0,85$; n = 26) и гиноиден тип ($WHR < 0,85$; n = 32) се анализирани отново всички изследвани параметри. Разпределението на пациентите със затлъстяване, наднормено и нормално тегло в групите са представени в **таблица 4.15**.

Таблица 4.15. Разпределение на пациентите със затлъстяване, наднормено и нормално тегло в групите

	СПЯ с андроиден тип (n = 26)	СПЯ с гиноиден тип (n = 32)
Затлъстяване (ИТМ ≥ 30 кг/м ²)	69,2% (18/26)	18,7% (6/32)
Наднормено тегло (ИТМ 25÷29.9 кг/м ²)	19,2% (5/26)	12,5% (4/32)
Нормално тегло (ИТМ $\leq 24,9$ кг/м ²)	11,6% (3/26)	68,8% (22/32)

Наблюдава се сигнификантна разлика в полза на СПЯ с андроиден тип преразпределение на мастната тъкан по отношение на всички изследвани антропометрични показатели, метаболитните показатели (с изключение на кръвната захар на гладно) и при част от клиничните параметри – хирзутизъм и acanthosis nigricans. СПЯ с андроиден тип са с по-високи нива на FAI от пациентите с гиноиден тип преразпределение на мастната тъкан (таблици 4.16., 4.17., 4.18).

Таблица 4.16. Антропометрични и клинични характеристики на групите

Параметър	СПЯ с андроиден тип (n = 26)	СПЯ с гиноиден тип (n = 32)	p value
Възраст (години)	26,9 ± 6,2	25,0 ± 4,1	NS
Тегло (кг)	84 (74,8; 95,9)	60 (56; 74,3)	< 0,001
Ръст (м)	1,61 (1,55; 1,65)	1,65 (1,61; 1,72)	0,008
ИТМ (кг/м ²)	32,7 ± 6,1	23,7 ± 5,6	< 0,001
WC (см)	101,5 (96; 115,3)	77 (71,3; 82,3)	< 0,001
НС (см)	104,5 (99,3; 112,8)	99 (91,3; 103)	0,009
Acanthosis nigricans	57,7% (15/26)	18,8% (6/32)	0,002
mFG score	10 (6,8; 16,5)	5,5 (3,3; 10,5)	0,010
Акне	23,1% (6/26)	25% (8/32)	NS
Олиго-аменорея	88,5% (23/26)	93,8% (30/32)	NS
ПКМЯ	80,8% (21/26)	90,6% (29/32)	NS

ИТМ – индекс на телесна маса; ПКМЯ – поликистозна морфология на яйчниците; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; mFG score – модифицирана скала на Ferriman-Gallwey; WC – обиколка на талията; WHR – талия/хани отношение. Нормално разпределение на данните, представено с mean (±SD). Неправилно разпределение на данните, представено с median (интерквартилен размах [IQR]). Категорийни величини представени като процент от общия брой – Chi-квадрат.

Таблица 4.17. Метаболитни характеристики на групите

Параметър	СПЯ с андроиден тип (n = 26)	СПЯ с гиноиден тип (n = 32)	p value
ПГГ (mmol/L)	5 (4,7; 5,4)	5 (4,8; 5,3)	NS
ПГ 120 мин (mmol/L)	5,9 (5,4; 6,9)	5,1 (4,2; 5,9)	0,002
ИРИ 0 мин (mU/L)	15,2 (9,9; 23,4)	6,6 (5; 9,4)	< 0,001
ИРИ 120 мин (mU/L)	73,1 (38,7; 135,9)	32 (21,8; 48,4)	0,003
НОМА-IR	3,42 (2,3; 5,66)	1,4 (1,03; 2,31)	< 0,001

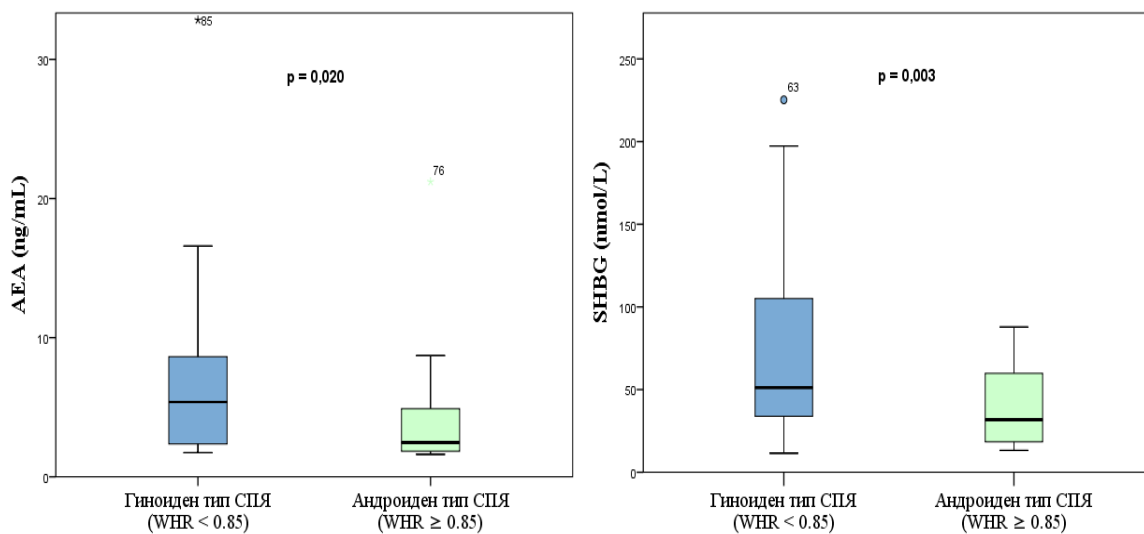
ИРИ – имунореактивен инсулин; ПГ- плазмена глюкоза; ПГГ – плазмена глюкоза на гладно; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; НОМА-IR – хомеостатичен индекс за оценка на инсулинова резистентност. Неправилно разпределение на данните, представено с median (интерквартилен размах [IQR]).

Таблица 4.18. Хормонални и биохимични характеристики на групите

	СПЯ с андроилен тип (n = 26)	СПЯ с гиноиден тип (n = 32)	p value
ЛХ (mU/mL)	6,3 (3,7; 8,4)	6,7 (5; 9)	NS
ФСХ (mU/mL)	5,3 (4,5; 6,1)	5,1 (4,2; 5,9)	NS
ЛХ/ФСХ отношение	1,2 (0,9; 1,5)	1,3 (1; 1,9)	NS
Естрадиол (pmol/L)	137,4 (111,8; 183)	129,7 (89,7; 237)	NS
Тестостерон (nmol/L)	1,6 (1,1; 2)	1,5 (1,1; 2,2)	NS
DHEAS (µmol/L)	9,1 (5,6; 11,5)	8,9 (6,5; 12,3)	NS
Андростендион (ng/mL)	4,1 (2,6; 5,5)	4,6 (3,5; 5,8)	NS
FAI	6,1 (2,4; 10)	2,6 (1,2; 4,8)	0,004
SHBG (nmol/L)	31,8 (18,3; 60,8)	51,2 (33,7; 106,4)	0,003
AEA (ng/mL)	2,5 (1,8; 5,1)	5,4 (2,3; 8,8)	0,020

ЛХ – лутеинизиращ хормон; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; ФСХ – фоликулостимулиращ хормон; AEA – анандамид; DHEAS - дихидроепиандростендион сулфат; FAI – свободен андрогенен индекс; SHBG – секс-хормон свързващ глобулин. Неправилно разпределение на данните, представено с median (интерквартилен размах [IQR]).

Сред СПЯ с гиноиден тип се наблюдават по-високи серумни нива на AEA и SHBG спрямо групата на СПЯ с андроилен тип разпределение на мастната тъкан, представени във **фигура 4.12**.



Фигура 4.12. Сравнение на нивата на АЕА и SHBG в двете подгрупи на СПЯ – гиноиден тип (WHR < 0,85) и андроиден тип (WHR ≥ 0,85); АЕА – анандамид; SHBG – секс-хормон свързващ глобулин; WHR – отношение талия/хани

4.6.2. Анализ на серумните нива на 2-arachidonoylglycerol при СПЯ в контекста на хормоналните и метаболитни нарушения и сред класическите фенотипове

В настоящето проучване са включени общо осемдесет участници - 54 пациенти със СПЯ и 26 здрави контроли. Съгласно Ротердамските критерии [10] пациентите са диагностицирани и категоризирани в четири фенотипни групи: Фенотип А (n = 30) - жени с трите диагностични критерия (олиго-ановулация [ОА] + хиперандрогенизъм [ХА] + ПКМЯ); Фенотип В (n = 20) - жени с ОА + ХА, без ПКМЯ; Фенотип С (n = 4) - жени с ХА + ПКМЯ, без ОА и Фенотип D (ОА + ПКМЯ, без ХА), който не се представи в кохортата от пациенти. Поради малкия брой пациенти от фенотип С, тази група се изключи от последващия анализ. Целта на проучването е да се анализира връзката на 2-arachidonoylglycerol (2-AG) с хормоналните и метаболитни промени и най-често срещаните характеристики при СПЯ като овулаторна дисфункция и ПКМЯ.

4.6.2.1. Сравнение между пациенти със СПЯ и здрави контроли

Пациентите със СПЯ и здравите контроли показват сходни демографски и антропометрични характеристики (ръст, тегло, ИТМ, WC и WHR), както и сходства в нивата на измерените метаболитни параметри като ПГГ, ИРИ на гладно, плазмена глюкоза и ИРИ на 120 минута, и НОМА-IR. Пациентите със СПЯ очаквано са по-хирзутни от здравите жени ($p = 0,001$). Всички андрогени са също значително по-високи в пациентската група, отколкото в групата на контролите. Съотношението ЛХ/ФСХ е сигнификантно по-високо в СПЯ групата ($p = 0,035$) в сравнение с контролната група. Нивата на 2-AG са по-високи в здравата контролна група, въпреки че не достигат статистическа значимост ($p = 0,053$). Нивата на АЕА между здрави и пациенти със СПЯ в този анализ също са сходни. Всички сравнения между пациентите със СПЯ и здравите контроли са представени в **таблица 4.19**.

Наблюдавани са само слаби отрицателни корелации между нивата на 2-AG и ЛХ/ФСХ отношението ($r = -0,298$, $p = 0,029$), също така и с mFG score ($r = -0,306$, $p = 0,025$). 2-AG не показва сигнификантна корелация с нивата на другия изследван ендоканабиноид - АЕА.

Таблица 4.19. Сравнение между пациенти със СПЯ и здрави контроли - демографски, антропометрични, метаболитни, биохимични, хормонални тестове и клинични характеристики

Показател	Жени със СПЯ (n = 54)	Здрави контроли (n = 26)	p value
<i>Демографски и антропометрични характеристики</i>			
Възраст (години)	25,9 (\pm 5,3)	27,9 (\pm 5,1)	NS
Тегло (кг)	74,2 (\pm 20,4)	76,9 (\pm 19)	NS
Ръст (м)	163 (\pm 7)	164 (\pm 5,3)	NS
ИТМ (кг/м ²)	27,5 (21; 33,1)	25,6 (22,5; 37,9)	NS
WC (см)	83,5 (76; 101,3)	85,5 (74; 96,8)	NS
HC (см)	100 (92; 110)	102 (94,5; 110,3)	NS
WHR	0,84 (0,78; 0,97)	0,81 (0,77; 0,91)	NS
<i>Хормонални и биохимични параметри</i>			
ЛХ (mU/mL)	7,64 (\pm 4,49)	6,19 (\pm 2,47)	NS
ФСХ (mU/mL)	5,2 (\pm 1,32)	5,54 (\pm 1,33)	NS
ЛХ/ФСХ отношение	1,49 (\pm 0,81)	1,11 (\pm 0,36)	0,035

Естрадиол (pmol/L)	130,5 (95,5; 183)	147,2 (99,5; 184,6)	NS
Общ тестостерон (nmol/L)	1,65 (± 0,73)	0,91 (± 0,34)	< 0,001
DHEAS (mcmol/L)	9,3 (6,5; 11,6)	5,5 (4,2; 7,3)	< 0,001
Андростендион (ng/mL)	4,49 (± 2,12)	2,27 (± 0,94)	< 0,001
FAI	3,37 (1,8; 6,8)	1,51 (1,1; 3,1)	0,002
SHBG (nmol/L)	42 (28,6; 74,3)	54 (28,3; 79)	NS
Метаболитни параметри			
ПГГ (mmol/L)	5,0 (4,7; 5,3)	5,1 (4,9; 5,3)	NS
ПГ 120` (mmol/L)	5,7 (4,9; 6,6)	5,5 (4,8; 6,3)	NS
ИРИ на гладно (mU/L)	9,6 (5,9; 16,8)	9,3 (6,2; 14,4)	NS
ИРИ 120` (mU/L)	43,4 (27,2; 85)	30,1 (17,2; 58,6)	NS
НОМА-IR	2,3 (1,3; 3,7)	2,2 (1,3; 3,3)	NS
Клинични характеристики			
mFG score	8 (4; 14)	3 (0,8; 6,3)	0,001
Акне	13/54	4/26	NS
Алоpecia	1/54	0/26	NS
Ендоканабиноид			
2-AG (ng/mL)	41,8 (6,8; 103,2)	102,6 (21,3; 206,3)	NS
AEA (ng/mL)	3,5 (1,9; 6,5)	2,8 (2,1; 8,4)	NS

ИТМ – индекс на телесна маса; ИРИ – имунореактивен инсулин; ИРИ 120` - имунореактивен инсулин на 120 минута; ЛХ – лутеинизиращ хормон; ПГГ – плазмена глюкоза на гладно; ПГ 120` - плазмена глюкоза на 120 минута; СПЯ – синдром на поликистозни яйчници; ФСХ – фоликулостимулиращ хормон; 2-AG - 2-арахидоноилглицерол; АЕА- анандамид; DHEAS – дехидроепиандростерон сулфат; FAI – свободен андрогенен индекс; HC – обиколка на ханси; НОМА-IR – хомеостатичен модел за оценка на инсулинова резистентност; mFG score – модифицирана скала на Ferriman Gallwey; SHBG – секс-хормон свързващ глобулин; WHR – отношение талия/ханси; WC – обиколка на талията. Нормално разпределените данни се представят със средни стойности (± SD). Неправилно разпределени данни се представят като медиана (IQR). Категоричните стойности се представят като дял от общия брой (n / N).

4.6.2.2. Сравнения между СПЯ фенотипове А и В и здравите контроли

Резултатите сочат, че поотделно фенотип А и В не се различават от здравите контроли по демографски, антропометрични и метаболитни параметри. Серумните нива на андрогените (общ тестостерон, DHEAS и андростендион) и mFG score са сигнификантно по-високи във фенотип А и В поотделно в сравнение с контролната група. ЛХ/ФСХ отношението е сигнификантно по-високо в групата на фенотип А спрямо фенотип В и здравите контроли, но FAI е по-висок в групата на фенотип В в сравнение с фенотип А и контролната група. Сравненията между групите са представени в **таблица 4.20**.

Таблица 4.20. Сравнения между СПЯ фенотипове А и В и здравите контроли

Показатели	Жени със СПЯ (n = 50)		Здрави жени (n = 26)
	Фенотип А (n = 30)	Фенотип В (n = 20)	
ЛХ/ФСХ отношение	1,67 (± 0,96)*	1,25 (± 0,58)	1,11 (± 0,36)
Общ тестостерон (nmol/L)	1,62 (± 0,77)*	1,63 (± 0,73)†	0,91 (± 0,34)
DHEAS (µmol/L)	8,7 (6,3; 11,5)*	9,3 (6,5; 12,8)†	5,5 (4,2; 7,3)
Андростендион (ng/mL)	4,64 (± 1,89)*	4,14 (± 2,35)†	2,27 (± 0,94)
FAI	2,54 (1,41; 6,27)	3,56 (2,36; 6,48)†	1,51 (1,1; 3,1)
mFG score	7,5 (4; 12,5)*	8 (2,3; 12)	3 (0,8; 6,3)
2-AG (ng/mL)	23,2 (6; 55,5)*§	112,3 (61,6; 300)	102,6 (21,3; 206,3)
AEA (ng/mL)	3,1 (1,8; 6,8)	3,8 (2,1; 6,2)	2,8 (2,1; 8,4)

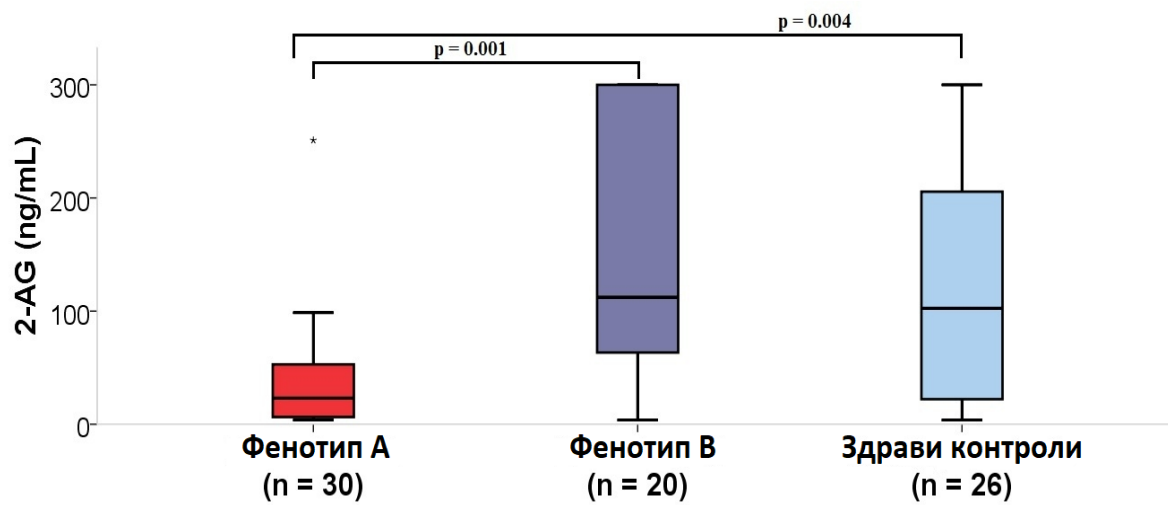
ЛХ - лутеинизиращ хормон; *СПЯ* - синдром на поликистозни яйчници; *ФСХ* - фоликулостимулиращ хормон; *2-AG* - 2-арахидоноилглицерол; *AEA* – анандамид; *DHEAS* - дехидроепиандростерон сулфат; *FAI* - свободен андрогенен индекс; *mFG score* - модифицирана скала на Ferriman Gallwey. Правилно разпределените данни са представени със средни стойности (± SD). Неправилно разпределените данни са представени като медиана (IQR). Тест на Kruskal-Wallis и Dunn-Bonferroni post-hoc анализи се използва за сравняване на две и повече независими проби.

* сигнификантност между фенотип А и контролите.

† сигнификантност между фенотип В и контролите.

§ сигнификантност между фенотип А и фенотип В.

Серумните нива на 2-AG са значително по-високи в групата на фенотип В и здравите контроли в сравнение с групата на фенотип А, както е представено на **фигура 4.13**. Нивата на ендоканабиноида остават сходни между фенотип В и контролите.



Фигура 4.13. Серумни нива на 2-AG между фенотип А, В и здрави контроли
2-AG - 2-арахидоноилглицерол

4.7. Изследване на цитокини, адипокини и миокини при пациенти със СПЯ и здрави контроли

4.7.1. Серумни нива на IL-18 при пациенти със СПЯ – анализ на връзката им с индекси за инсулинова резистентност, генерализирано и висцерално затлъстяване

Изследването има за цел да определи нивата на IL-18 при жени със СПЯ, да ги сравни с тези при здрави контроли, да анализира връзката на цитокина с различни маркери за генерализирано и висцерално затлъстяване, инсулинова резистентност и хиперандрогенизъм и да определи кои от тези променливи независимо определят нивата на IL-18.

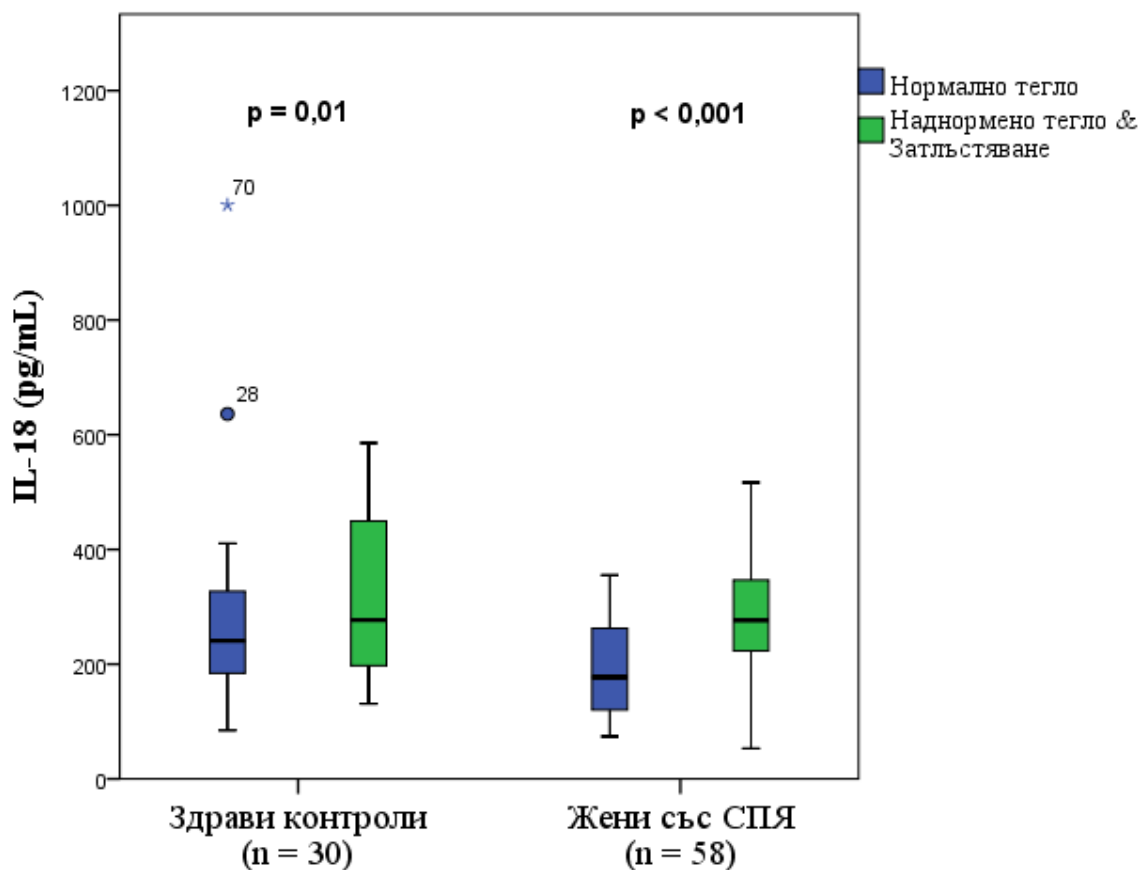
В изследването са включени 88 жени – 58 пациенти със СПЯ ($25,9 \pm 5,2$ години) и 30 здрави контроли ($27,6 \pm 5,2$ години). Сравненията по антропометрични, метаболитни, хормонални и клинични параметри са същите като представените в анализа на SHBG и АЕА (подраздел 4.6.1). По отношение на серумните нива на IL-18 двете групи не се различават сигнификантно ($211,8 [134,6; 308,3]$ pg/mL за пациенти със СПЯ срещу $249,8 [179,9; 367,1]$ pg/mL за контролите, $p = 0,081$).

4.7.1.1. Сравнение между жени с наднормено тегло/затлъстяване и жени с нормално тегло в групите

Когато всички участници са вземат под внимание ($n = 88$), нивата на IL-18 са по-високи при жените с наднормено тегло/затлъстяване ($n = 50$) в сравнение с жените с нормално тегло ($n = 38$) ($300,8 [211,4; 357]$ срещу $177,5 [114,5; 210,9]$ съответно, $p < 0,001$), както и в двете групи поотделно – контролна група ($313,5 [199,6; 461,6]$ срещу $202,5 [132,3; 249,8]$ съответно, $p = 0,01$) и група на СПЯ ($295,4 [223,1; 344,3]$ срещу $135 [112,3; 192,3]$ съответно, $p < 0,001$).

Когато се сравняват нивата на IL-18 между жените със СПЯ с наднормено тегло/затлъстяване и здравите контроли с наднормено тегло/затлъстяване, те не показват значителна разлика ($313,5 [199,6; 41,6]$ срещу $295,4 [223,1; 344,3]$, $p = 0,208$). Подобни резултати се наблюдават при сравняване на жени с нормално тегло в двете

групи (202,5 [132,3; 249,8] срещу 135 [112,3; 192,3], $p = 0,064$). Сравненията са онагледени във **фигура 4.14**.



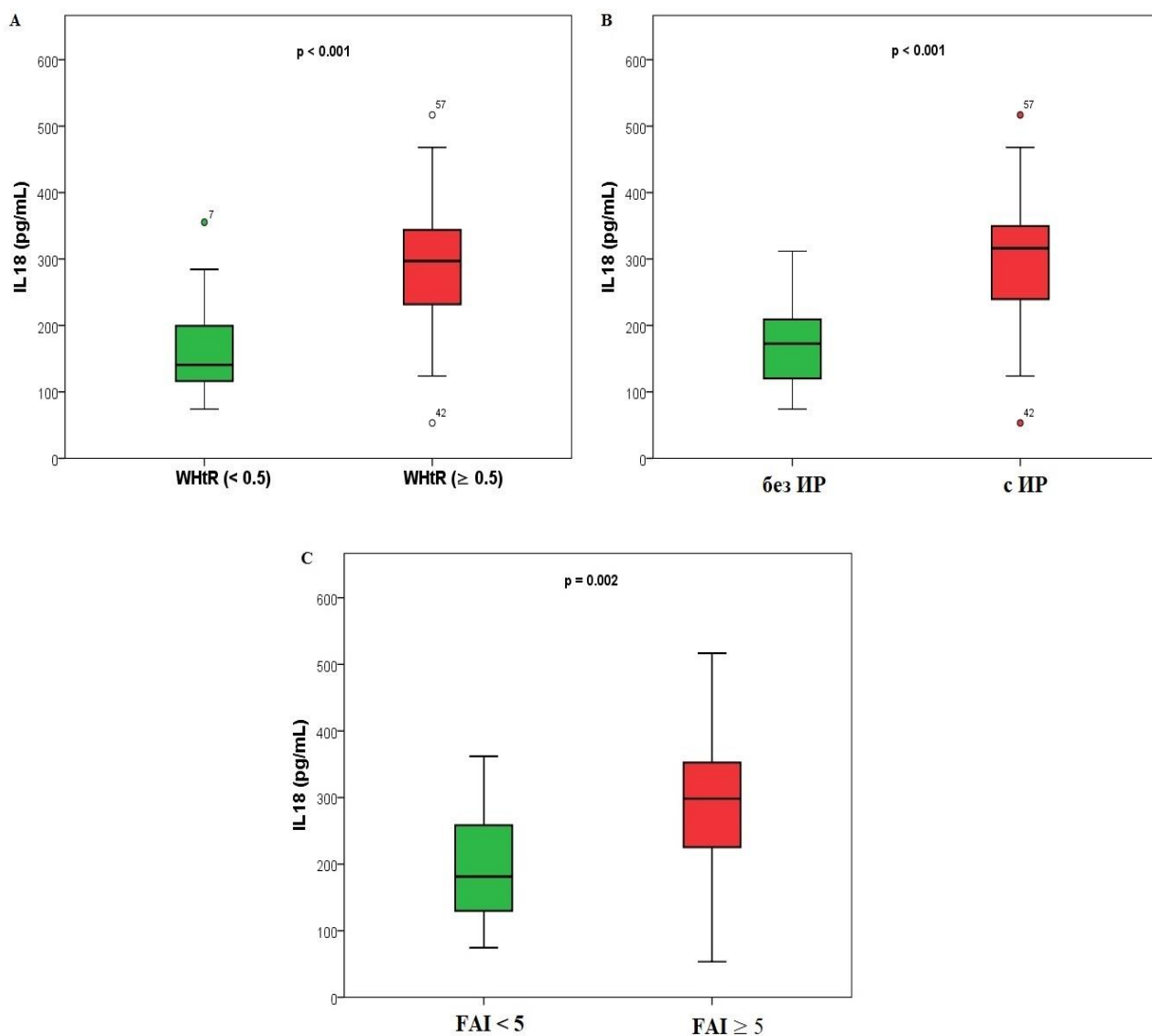
Фигура 4.14. Анализ на нивата на IL-18 в изследваната популация

Жените с наднормено тегло/затлъстяване имат по-високи серумни нива на IL-18 от жените с нормално тегло както при здравите контроли, така и при пациентите със СПЯ заедно и поотделно. Липсва сигнификантна разлика в нивата на IL-18 между пациенти с наднормено тегло/затлъстяване ($n = 33$) и контроли с наднормено тегло/затлъстяване ($n = 17$), както и между пациенти с нормално тегло ($n = 25$) и контроли с нормално тегло ($n = 13$)

4.7.1.2. Субанализи в групата на СПЯ

Подробен анализ в групата на СПЯ показва, че пациентите с висок WHtR $\geq 0,5$ имат по-високи нива на IL-18, отколкото участниците с нисък WHtR $< 0,5$ (296,8 [227,5; 344,1] срещу 140,8 [115,7; 200,8], $p < 0,001$) (**Фигура 4.15.А**). Нивата на IL-18 са значително повишени при пациенти със СПЯ и инсулинова резистентност (ИР),

отколкото тези без ИП (316,3 [237,1; 352,5] срещу 172,5 [119; 211,8], $p < 0,001$) (Фигура 4.15.В). Нивата на IL-18 също са по-високи при жени със СПЯ и висок FAI ≥ 5 , отколкото при пациенти с нормален FAI < 5 (298,3 [214,5; 355,3] срещу 181,1 [129,1; 262,4], $p = 0,002$) (Фигура 4.15.С).



Фигура 4.15. Анализ на нивата на IL-18 при жени със СПЯ

(А) Разлика в серумните нива на IL-18 между жени с WHtR $< 0,5$ ($n = 28$) и WHtR $\geq 0,5$ ($n = 30$). (В) Разлика в серумните нива на IL-18 между пациенти без ИП ($n = 33$) и с ИП ($n = 25$). (С) Разлика в серумните нива на IL-18 между групата с нормални нива на FAI < 5 ($n = 39$) и високи FAI ≥ 5 ($n = 19$). *ИП* - инсулинова резистентност; *FAI* – свободен андрогенен индекс; *IL-18* – интерлевкин-18; *WHtR* – съотношение между талия и ръст

4.7.1.3. Корелационен анализ на нивата на IL-18 при пациенти и контроли

Нивата на IL-18 корелират положително с почти всички антропометрични и метаболитни параметри в групата на СПЯ, представени в **таблица 4.21**.

Таблица 4.21. Корелационен анализ на нивата на IL-18 в групата на СПЯ

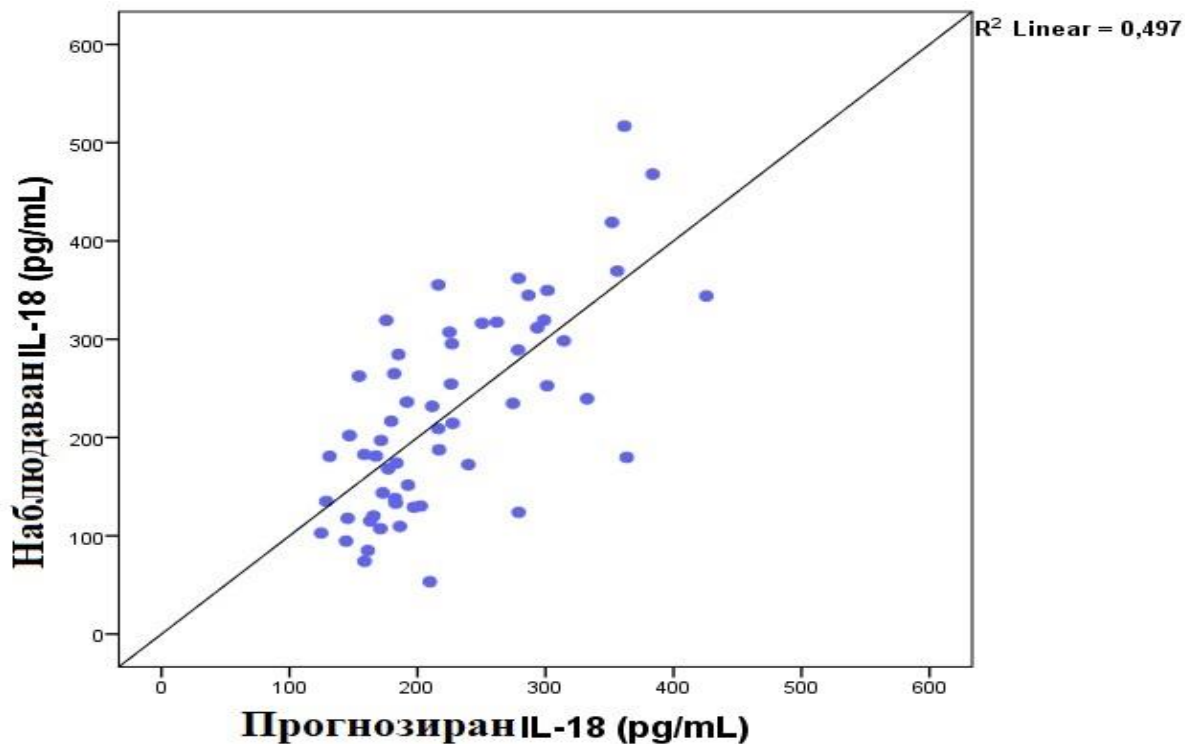
Параметър	r	p
ИТМ (кг/м ²)	0,556	< 0,001
Тегло (кг)	0,544	< 0,001
Ръст (м)	-0,089	NS
WC (см)	0,598	< 0,001
HC (см)	0,506	< 0,001
WHR	0,420	0,001
WHtR	0,553	< 0,001
ПГГ (mmol/L)	0,351	0,007
ПГ 60` (mmol/L)	0,322	0,015
ПГ 120` (mmol/L)	0,227	NS
ИРИ 0` (mU/L)	0,634	< 0,001
ИРИ 60` (mU/L)	0,352	0,008
ИРИ 120` (mU/L)	0,356	0,006
НОМА-IR	0,639	< 0,001
mFG score	0,286	0,030
ЛХ (mU/mL)	-0,169	NS
ФСХ (mU/mL)	-0,099	NS
ЛХ/ФСХ отношение	-0,102	NS
Естрадиол (pmol/L)	0,073	NS
Общ тестостерон (nmol/L)	0,055	NS
DHEAS (μmol/L)	-0,040	NS
Андростендион (ng/mL)	-0,099	NS
FAI	0,232	NS
SHBG (nmol/L)	-0,240	NS

ИРИ – имунореактивен инсулин; ИТМ – индекс на телесна маса; ЛХ – лутеинизиращ хормон; ПГГ – плазмена глюкоза на гладно; ПГ – плазмена глюкоза; ФСХ – фоликулостимулиращ хормон; DHEAS – дехидроепиандростерон сулфат; FAI – свободен андрогенен индекс; НОМА-IR – хомеостатичен модел за оценка на инсулинова резистентност; HC – обиколка на ханша; mFG score – модифицирана скала на Ferriman Gallway; SHBG – секс-хормон свързващ глобулин; WHR – талия/ханши отношение; WHtR – талия/ръст отношение; WC – обиколка на талията. Pearson and Spearman корелационен анализ (Rho) е използван за правилно и неправилно разпределените данни, респективно.

В контролната група серумните нива на IL-18 не показват корелация с хормоналните и повечето от антропометричните и метаболитните параметри. В здравата група нивата на IL-18 корелират слабо и положително само с WHtR ($r = 0,381$; $p = 0,038$) и ИРИ 60 мин ($r = 0,434$; $p = 0,017$).

4.7.1.4. Множествена линейна регресия в групата на СПЯ

Множествена линейна регресия се извърши, за да се определят кои от докладваните демографски, антропометрични и метаболитни характеристики в пациентската група прогнозира в най-голяма степен нивата на IL-18. Използвайки forward stepwise регресионен анализ се установи, че параметрите - възраст, WC и ИРИ на гладно, най-силно отразяват нивата на IL-18. Тези променливи значително предсказват нивата на IL-18, $F(3, 55) = 17,817$, $p < 0,001$, $R^2 = 0,497$, като и трите променливи добавят статистическа значимост към модела за прогнозиране, $p < 0,05$ (Фигура 4.16).



Фигура 4.16. Диаграма на разсейване

Изобразява връзката между наблюдаваните и прогнозираните стойности на IL-18 според модел на линейна регресия с IL-18 като зависима променлива и независимите променливи – възраст, WC и ИРИ на гладно. Приблизително 50% от вариациите в IL-18 могат да бъдат обяснени с тези три променливи. *ИРИ* - имунореактивен инсулин; *IL-18* – интерлевкин - 18; *WC* – обиколка на талията

4.7.2. Изследване на адипокините – Зонулин и Meteorin-like (Metrnl)

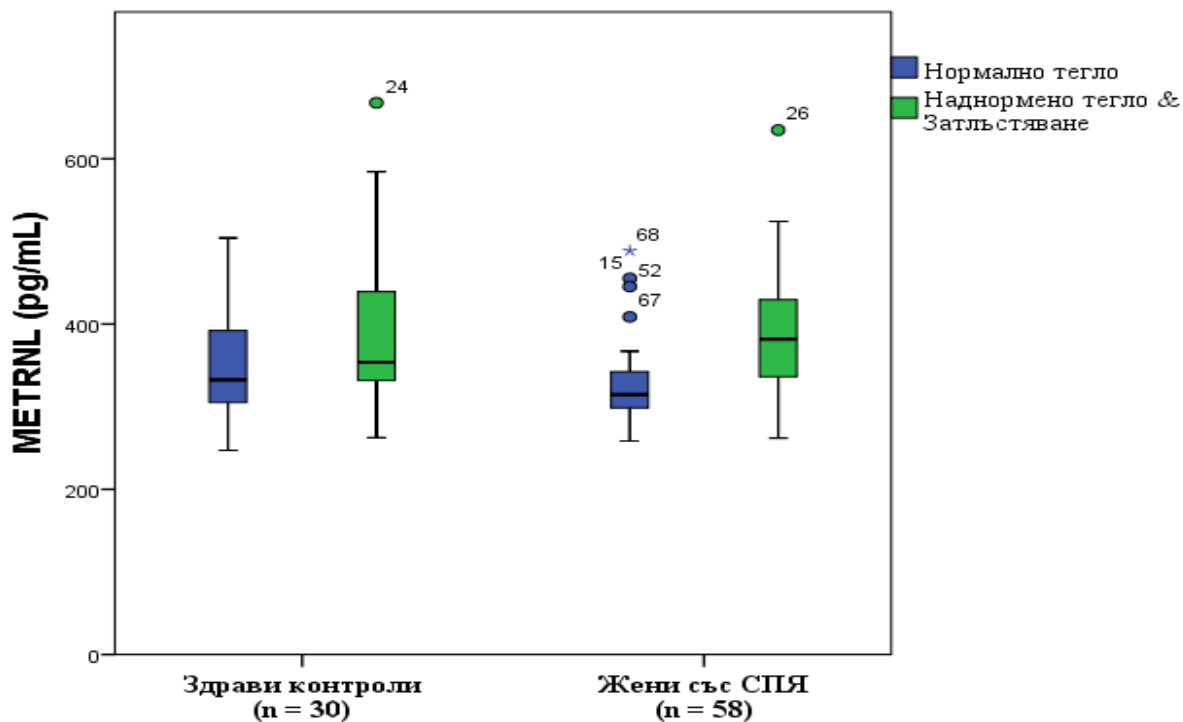
Проведе се изследване на серумните нива на двата адипокина – Зонулин и Metrnl сред 88 жени, разделени в две групи – 58 жени със СПЯ и 30 здрави контроли. Целта на проучването е да се анализират и сравнят нивата на двата адипокина между жени със СПЯ и здрава контроли, както и да се потърси връзка с антропометричните, метаболитните и хормонални показатели при синдрома.

Анализите на демографските, антропометричните, клиничните и хормоналните параметри в двете групи на пациенти и контроли са аналогични на проведените в изследванията на АЕА, SHBG и IL-18 (раздели 4.6.1. и 4.7.1). При анализа на двата адипокина пациентите и контролите не показват сигнификантна разлика. Средните стойности на Metrnl в СПЯ групата и при здравите контроли са съответно $365 \pm 74,1$ pg/mL срещу $369,7 \pm 93,3$ pg/mL, $p > 0,05$. Медианата за изследвания адипокин зонулин в двете групи е както следва: 8 [6,9; 11] ng/mL за СПЯ групата и 9,2 [6,2; 14,6] ng/mL за контролната група ($p > 0,05$).

4.7.2.1. Сравнение между жени с наднормено тегло/затлъстяване и жени с нормално тегло в групите

Подобно на анализа с IL-18 и в това изследване се проведе сравнение на нивата на зонулин и Metrnl между жени с наднормено тегло/затлъстяване ($\text{ИТМ} \geq 25 \text{ кг/м}^2$) и жени с нормално тегло ($\text{ИТМ} < 24,9 > 18,5 \text{ кг/м}^2$). Нивата на Metrnl са сигнификантно по-високи сред жените в наднормено тегло/затлъстяване от тези с нормално тегло, както сред всички участници ($390,3 \pm 85,6$ срещу $335,3 \pm 61,8$ pg/mL съответно, $p < 0,001$), така и в групата на СПЯ ($390,5 \pm 74,2$ срещу $331,3 \pm 60,1$ pg/mL съответно, $p = 0,001$). Подобна зависимост обаче не се наблюдава в здравата група (390 ± 107 срещу $343 \pm 66,7$ pg/mL съответно, $p = 0,217$). При сравнение между пациенти и здрави само сред жените с нормално тегло ($331,3 \pm 60,2$ срещу $343,1 \pm 66,7$ pg/mL съответно, $p = 0,528$) или само сред жените с наднормено тегло/затлъстяване ($390,5 \pm 74,2$ срещу 390 ± 107 pg/mL съответно, $p = 0,546$) – сигнификантна разлика също не се установи. В обобщение нивата на Metrnl са сигнификантно по-високи сред жените с наднормено тегло/затлъстяване от тези с

нормално тегло, но тази зависимост не е специфична за СПЯ групата (фигура 4.17).



Фигура 4.17. Сравнение на нивата на Metrnl между жени с наднормено тегло/затлъстяване и жени с нормално тегло в общата изследвана популация (n = 88) и в двете групи поотделно. Нивата на Metrnl са сигнификантно по-високи сред жените с наднормено тегло/затлъстяване (n = 50) срещу жените с нормално тегло (n = 38) сред всички 88 участници (p < 0,001). В анализа на СПЯ-групата отделно жените с наднормено тегло/затлъстяване (n = 33) имат също по-високи нива спрямо пациентите с нормално тегло (n = 25) (p = 0,001). В анализа на здравата група подобна зависимост между жените с наднормено тегло/затлъстяване (n = 17) и нормално тегло (n = 13) не се установи. Няма сигнификантна разлика между пациенти и контроли при сравнение само между жените с наднормено тегло/затлъстяване или между жените с нормално тегло в двете групи

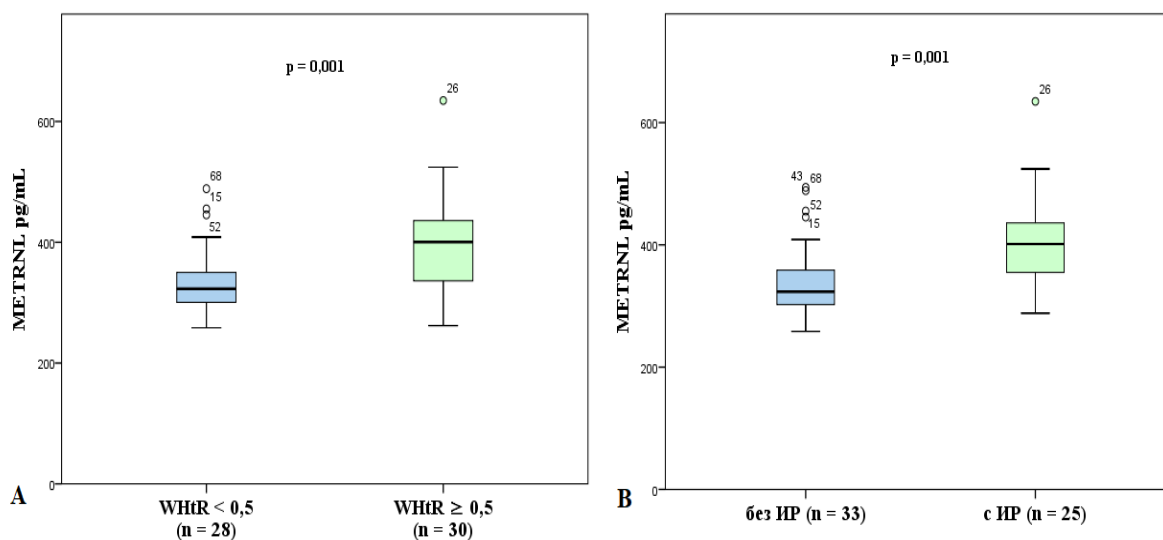
4.7.2.2. Субанализи в групата на СПЯ

Подобно на изследването на IL-18 и в този анализ на зонулин и Metrnl са проведени три поданализа. Групата на пациентите със СПЯ се раздели

последователно на подгрупи с висок WHtR ($\geq 0,5$; $n = 30$) и нисък WHtR ($< 0,5$; $n = 28$), като анализът показва сигнификантно по-високи нива на адипокина в групата на WHtR $\geq 0,5$ спрямо групата с нисък WHtR ($395,1 \pm 76,1$ срещу $332,7 \pm 57,3$ съответно, $p = 0,001$) (фигура 4.18А).

Във втория поданализ групата на СПЯ се раздели според инсулиновата резистентност (ИР) на СПЯ с ИР ($n = 25$) и СПЯ без ИР ($n = 33$). Резултатите от този поданализ показват значимо по-високи нива на Metrnl в подгрупа СПЯ с ИР спрямо СПЯ без ИР ($399,6 \pm 74,6$ срещу $338,7 \pm 62,9$ съответно, $p = 0,001$) (фигура 4.18В).

В субанализа на СПЯ групата спрямо FAI сигнификантна разлика не се наблюдава между групите FAI < 5 ($n = 39$) и FAI ≥ 5 ($n = 19$) – ($354,1 \pm 62,5$ срещу $387,2 \pm 91,4$ съответно, $p > 0,05$), за разлика от анализа с IL-18. Серумните нива на зонулин показват сходни стойности във всеки от трите поданализа.



Фигура 4.18. Сравнение в нивата на Metrnl в двете субгрупи на СПЯ А) Сравнение между групите с нисък и висок WHtR В) Сравнение между групите с/без ИР *ИР* – инсулинова резистентност; *Metrnl* – meteorin-like; *WHtR* – талия/ръст отношение

4.7.2.3. Корелационен анализ на зонулин и Metrnl в групите

Нивата на Metrnl корелират сигнификантно с повечето от антропометричните и метаболитни параметри, също със SHBG и IL-18 в групата на СПЯ, представени в

таблица 4.22. При здравите контроли се наблюдава само една позитивна корелация между Metrnl и WHtR ($r = 0,369$; $p = 0,045$). Зонулин не показва сигнификантна корелация с нито един от изследваните параметри в групите.

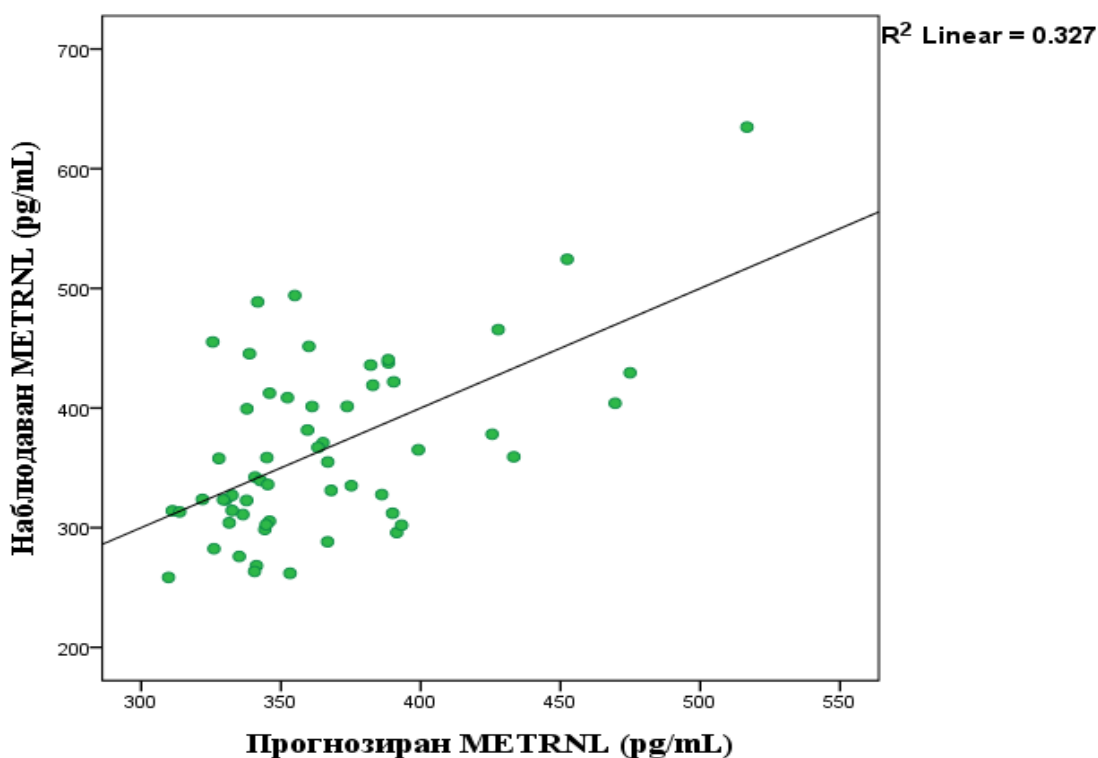
Таблица 4.22. Корелационен анализ на Metrnl в СПЯ групата

Параметър	r	p
Възраст (години)	0,169	NS
Тегло (кг)	0,452	< 0,001
Ръст (м)	0,011	NS
ИТМ (кг/м ²)	0,368	0,004
WC	0,423	0,001
HC	0,445	< 0,001
WHR	0,257	NS
WHtR	0,401	0,002
ПГГ (mmol/L)	0,319	0,015
ПГ 60` (mmol/L)	0,178	NS
ПГ 120` (mmol/L)	0,148	NS
ИРИ 0` (mU/L)	0,391	0,002
ИРИ 60` (mU/L)	0,247	NS
ИРИ 120` (mU/L)	0,235	NS
НОМА-IR	0,411	0,001
mFG score	0,114	NS
ЛХ (mU/mL)	-0,012	NS
ФСХ (mU/mL)	-0,137	NS
ЛХ/ФСХ отношение	0,058	NS
Естрадиол (pmol/L)	0,051	NS
Общ тестостерон (nmol/L)	0,062	NS
DHEAS (µmol/L)	0,045	NS
Андростендион (ng/mL)	-0,092	NS
FAI	0,255	NS
SHBG (nmol/L)	-0,272	0,039
IL-18 (pg/mL)	0,312	0,017

ИРИ – имунореактивен инсулин; *ИТМ* – индекс на телесна маса; *ЛХ* – лутеинизиращ хормон; *ПГГ* – плазмена глюкоза на гладно; *ПГ* – плазмена глюкоза; *ФСХ* – фоликулостимулиращ хормон; *DHEAS* – дехидроепиандростерон сулфат; *FAI* – свободен андрогенен индекс; *НОМА-IR* – хомеостатичен модел за оценка на инсулинова резистентност; *HC* – обиколка на ханша; *IL-18* – интерлевкин-18; *mFG score* – модифицирана скала на Ferriman Gallway; *SHBG* – секс-хормон свързващ глобулин; *WHR* – талия/ханши отношение; *WHtR* – талия/ръст отношение; *WC* – обиколка на талията. Pearson and Spearman корелационен анализ (*Rho*) е използван за правилно и неправилно разпределените данни, респективно.

4.7.2.4. Множествен линеен регресионен анализ на нивата на *Metrn1* в групата на СПЯ

Множествен линеен регресионен анализ се проведе, за да се определи кой от демографския, антропометричните и метаболитни показатели прогнозира в най-голяма степен нивата на *Metrn1*. В анализа се заложи *Metrn1* като зависим параметър и показателите – възраст, ИТМ и НОМА-IR като независими предиктори. Те предсказват нивата на *Metrn1*, $F(3; 54) = 8,75$, $p < 0,001$, $R^2 = 0,327$, като от трите показателя само НОМА-IR добавя статистическа значимост към модела за прогнозиране, $p = 0,001$ (фигура 4.19).



Фигура 4.19. Диаграма на разсейване

Изобразява връзката между наблюдаваните и прогнозираните стойности на *Metrn1* според модел на линейна регресия с *Metrn1* като зависима променлива и независимите променливи – възраст, ИТМ и НОМА-IR. Приблизително 33% от вариациите в *Metrn1* могат да бъдат обяснени с тези три променливи, от които само НОМА-IR допринася за статистическата значимост. *ИТМ* – индекс на телесна маса; *НОМА-IR* – хомеостатичен модел за оценка на инсулинова резистентност; *Metrn1* – meteorin-like.

4.7.3. Изследване на миокините – Мионектин, IL-15 и BDNF при пациенти със СПЯ и здрави контроли

В изследването на миокините участват същите 88 жени – 58 пациенти със СПЯ и 30 здрави контроли, включени в изследванията на по-горе представените биомаркери – АЕА, SHBG, IL-18, зонулин и Metrn1. Съответно анализите по антропометрични, демографски, метаболитни, клинични и хормонални параметри между двете групи са идентични (раздели 4.6.1, 4.7.1 и 4.7.2).

Целта на този анализ е да се изследват, сравнят и анализират три малко проучени миокина сред пациенти със СПЯ и здрави контроли, като се допълнително изследва и връзката им метаболитните, клиничните и хормонални характеристики на синдрома.

При сравнение на нивата на IL-15 между двете групи се установи, че пациентите със СПЯ имат сигнификантно по-ниски нива спрямо здравите контроли. По отношение на мионектин анализът показва, че неговите нива също са по-ниски сред пациентите отколкото при здравите, но разликата не достигна статистическа значимост ($p = 0,066$). Изследванията с BDNF установяват, че нивата му са по-високи сред жените със СПЯ отколкото при здравите доброволци, но и тук не се наблюдава статистическа разлика ($p = 0,066$) (таблица 4.23).

Таблица 4.23. Сравнение на нивата на IL-15, Мионектин и BDNF между здрави и пациенти със СПЯ

Параметър	Жени със СПЯ (n = 58)	Здрави контроли (n = 30)	p value
IL-15 (pg/mL)	13,9 [11,3; 320]	77,8 [13,5; 1049]	0,027
Мионектин (ng/mL)	0,99 [0,66; 1,47]	1,32 [0,78; 2,05]	NS
BDNF (pg/mL)	1552,7 [1091; 1982]	1334 [920,8; 1740]	NS

СПЯ - синдром на поликистозни яйчници; BDNF - brain-derived neurotrophic factor; IL-15 – интерлевкин-15; NS – липса на сигнификантност. Неправилно разпределение на данните, представено с median (интерквартилен размах [IQR]).

4.7.3.1. Корелационен анализ на миокините – IL-15, мионектин, BDNF в СПЯ групата

IL-15 показва сигнификантна негативна корелация с WHR и някои от метаболитните параметри, отразени в **таблица 4.24**. С всички останали антропометрични, клинични, метаболитни, хормонални параметри и биомаркери сигнификантна корелация не се наблюдава. Мионектин показва само една позитивна корелация със серумните нива на зонулин ($r = 0,403$; $p = 0,002$). От своя страна BDNF корелира позитивно само със SHBG ($r = 0,284$; $p = 0,031$).

Таблица 4.24. Корелационен анализ на IL-15 в групата на пациентите със СПЯ

Параметър	r	p
Възраст (години)	-0,011	NS
ИТМ (кг/м ²)	-0,059	NS
WHR	-0,266	0,044
WHtR	-0,129	NS
ПГГ (mmol/L)	-0,203	NS
ПГ 60` (mmol/L)	-0,505	< 0,001
ПГ 120` (mmol/L)	-0,371	0,004
ИРИ 0` (mU/L)	-0,172	NS
ИРИ 60` (mU/L)	-0,338	0,012
ИРИ 120` (mU/L)	-0,294	0,025
НОМА-IR	-0,199	NS

ИРИ – имунореактивен инсулин; ИТМ – индекс на телесна маса; ПГГ – плазмена глюкоза на гладно; ПГ – плазмена глюкоза; НОМА-IR – хомеостатичен модел за оценка на инсулинова резистентност; WHR – талия/ханси отношение; Pearson and Spearman корелационен анализ (Rho) е използван за правилно и неправилно разпределените данни, респективно.

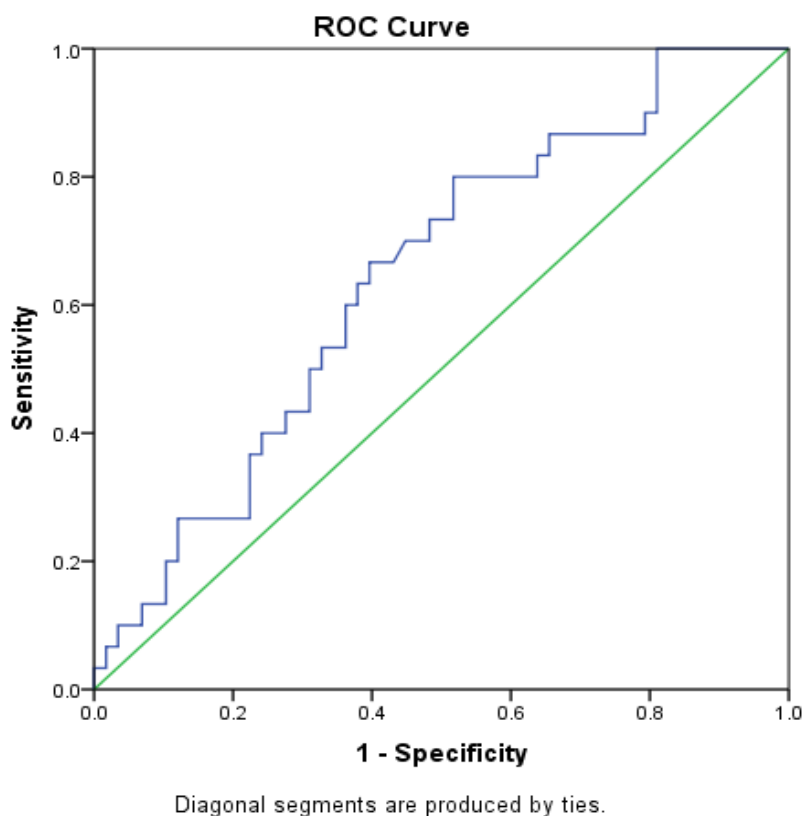
4.7.3.2. Субанализи на IL-15 в групата на СПЯ

В два субанализа нивата на IL-15 се сравнени в пациентската група, стратифицирана първо според ИТМ на жени с нормално тегло и жени с наднормено тегло/затлъстяване и втори според WHR на жени с нормален WHR ($< 0,85$) и повишен WHR ($\geq 0,85$).

В първия поданализ жените с нормално тегло и тези с наднормено тегло/затлъстяване не се различават сигнификантно (12,7 [11,3; 647,7] срещу 14,2 [11,2; 191,6], съответно, $p = 0,621$). Във втория поданализ жените с нормално WHR ($< 0,85$) също не се различават сигнификантно по отношение на IL-15 спрямо жените с повишен WHR ($\geq 0,85$) (17,2 [11,5; 711,6] срещу 12,2 [6,7; 135,8], съответно, $p = 0,052$).

4.7.3.3. ROC анализ на нивата на IL-15 в групите – пациенти със СПЯ и здрави контроли

С цел определяне коя стойност на IL-15 би могла да диференцира здрави от пациенти със СПЯ се проведе ROC анализ и построи крива. AUC за серумните нива на IL-15 е 0,644 с 95% доверителен интервал от 0,526 до 0,762. ROC анализът определи гранични нива на IL-15 от 23,5 pg/mL с чувствителност 63,3% и специфичност 62,1% за диференциация между здрави и пациенти (фигура 4.20).



Фигура 4.20. ROC крива на серумните нива на IL-15, дискриминиращи здрави от пациенти със СПЯ

5. ОБСЪЖДАНЕ

В настоящото проучване си поставяме за цел да извършим комплексна клинична оценка на нашата кохорта от пациенти със СПЯ, като сравним показателите им с тези при здрави контроли. Фокусът в първата част от анализите ни е да проведем анализ на всеки от клиничните показатели, част от които са и диагностични компоненти, както сред всички участници в изследването, така и сред фенотипните групи на СПЯ. Проведените изследвания за качество на живот и сексуална функция в групите обогати допълнително клиничния анализ, като позволи да се извърши оценка на СПЯ и по отношение аспектите на психологическо благополучие. Анализира се също връзката между СПЯ и често срещаното метаболитно-асоциирано заболяване остеоартроза през призмата на хиперандрогенизма.

Фокусът във втората част от анализите ни е да изследваме и съпоставим резултатите на добре познати и използвани в рутинната клинична практика показатели за диагноза с други иновативни и малко проучени биомаркери, с цел постигане на по-задълбочен анализ на СПЯ в патофизиологичен аспект и по-комплексна оценка в диагностичен план. По този начин се извлече ценна информация от една страна за клиничните характеристики на синдрома като хиперандрогенизъм, менструация, фертилитет, психологическо благополучие и сексуална функция както за групата като цяло, така и за всяка от фенотипните подгрупи. От друга страна получената информация ни позволи да дообогатим и в някои аспекти затвърдим познанията си относно сложните и взаимосвързани патофизиологични механизми на синдрома.

СПЯ е хетерогенно ендокринно-метаболитно нарушение, характеризиращо се с комбинация от симптоми и признаци на андрогенен ексцес (хирзутизъм и/или хиперандрогенемия), овулаторна дисфункция (менструални нарушения по типа на олиго-аменорея), поликистозна структура на яйчниците и ановулаторен инфертилитет), метаболитни нарушения (повишен риск от инсулинова резистентност, предиабет, захарен диабет тип 2, метаболитен синдром и сърдечно-съдови заболявания) и психологически неблагоприятия (повишена тревожност и депресивност, нарушено качество на живот). Докладваната честотата на синдрома в

литературата варира между 5,5% и 19,9% [9], което определя СПЯ като една от най-честите ендокринопатии, засягащи жените в репродуктивна възраст.

По-важни обаче са данните, че до 70% от жените, страдащи от синдрома, остават недиагностицирани [1, 11]. В международен и локален мащаб интересът към СПЯ остава все още твърде нисък [336]. Същите наблюдения се установяват и по отношение на фармацевтичната индустрия, вземайки предвид фактът, че голяма част от възможните медикаменти за лечение като орални контрацептиви, антиандрогени, инсулин-очувствяващи медикаменти и ароматазни инхибитори не са специфично разрешени за лечение при СПЯ както от Food and Drug Administration (FDA), така и European Medicines Agency (EMA) [337]. В допълнение към това синдромът остава един от слабо разбраните медицински проблеми, както сред пациентите, така и сред лекарите [338] и учените [339]. Всички тези факти в комбинация и с хетерогенната природа на синдрома, неадекватността на неговото именуване, спорния въпрос около неговата дефиниция и все още съществуващите неясноти относно неговата етиология и патофизиология са едни от възможните обяснения за наблюдавания висок процент недиагностицирани жени със СПЯ в световен мащаб [340]. Предвид известните проблеми на здравната система в България, може да предположим, че този дял би могъл да е и по-висок у нас. Повишаването на информираността както сред пациентите, така и сред лекарите, и добрата колаборация между тях би могло да повлияе благоприятно за намаляване дела на недиагностицираните жени със СПЯ. Ние вярваме, че подкрепа в този дълъг процес би могло да бъде всяко изследване, фокусирано върху проблемите на синдрома.

5.1. Общ анализ по демографски, антропометрични и клинични характеристики в групите

В настоящето проучване пациентите със СПЯ са последователно включени от болничната и доболничната помощ, потърсили самостоятелно или след препоръка от друг специалист (акушер-гинеколог, дерматолог) консултация с ендокринолог във връзка най-често с кожни прояви или менструални нарушения и по-рядко репродуктивни проблеми. Контролите са подбрани, така че да бъдат балансирани по

възраст и ИТМ с участниците в пациентската група. Средната възраст в двете групи е около 27 години, а средните стойности на ИТМ сред пациентите и контролите е около 27-28 кг/м². Въпреки че групите не се различават сигнификантно по ИТМ прави впечатление, че процентът на жените със затлъстяване е по-голям в групата на СПЯ отколкото в здравата група, макар да не се достига статистически значима разлика.

Налице е добре позната асоциацията между СПЯ и затлъстяването [62], като по литературни данни затлъстяване се установява при поне 30% от жените със СПЯ, а според други изследователи честотата може да достига до 75% [341]. В нашия анализ процентът на жените със затлъстяване в групата на СПЯ е 41,1%, за сравнение при контролите той е 29,7%. Все пак като процентното съотношение във всяка от групите, жените с нормално тегло преобладават (43,6% в СПЯ групата срещу 46% в здравата кохорта). Не бива да бъде пренебрегван и делът на жените с наднормено тегло в групите, който като процентно съотношение е по-голям в контролната група (24,3%) срещу 15,3% в пациентската кохорта. Тези резултати ни дават информация за степента на изява на генерализирано затлъстяване сред групите, но реално не получаваме информация за преразпределението на мастната тъкан и делът на жените с абдоминален и гиноиден тип.

Висцералната мастна тъкан е добре известно, че има негативно влияние върху метаболизма с множеството адипокини, които синтезира, и играейки съществена роля като депо за различни мастноразтворими стероиди (включително и андрогени), в което протича интензивен метаболизъм на половите хормони [132-134]. В този смисъл определянето на типа на преразпределение на мастната тъкан има важно значение за изявата на наблюдаваните метаболитни нарушения при СПЯ. Докладван е в литературата по-висок дял на централния (андроиден) тип затлъстяване при жените със синдрома спрямо периферния (гиноиден) тип [63], което допълнително е асоциирано с по-честа изява на хормонални нарушения, менструални смущения и инфертилитет [61]. Затова важни са резултатите от анализа по антропометричните показатели – обиколка на талията (WC), талия/ханш отношение (WHR) и талия/ръст отношение (WHtR), за които е потвърдено в множество изследвания, че са по-

надеждни показатели в оценката на метаболитния и сърдечно-съдовия риск от ИТМ [67-69].

В настоящето проучване пациентите и контролите показват сходство в данните и по отношение на антропометричните показатели – тегло, ръст, WC, HC, WHR и WHtR. Прави впечатление, че средната стойност на WC и в двете групи е над 80 см, която надвишава препоръчаната норма за жени според WHO [329]. Съответно делът на жените с WC над нормата надвишава този на жените с нормална обиколка на талията в двете групи (61,3% за СПЯ групата и 59,5% за контролната група). За разлика от данните за WC, резултатите ни от анализа на WHR не показват същата тенденция. Въпреки че средната стойност на WHR в групата на пациентите е $\geq 0,85$, която също надвишава препоръчаната норма за жени според WHO [329], в контролната група средната стойност е нормална ($< 0,85$) и делът на жените с нормално съотношение талия/ханш преобладава в двете групи (55,6% в СПЯ групата срещу 64,9% в контролната група).

По отношение на WHtR резултатите отново показват нормална средна стойност в контролната група ($< 0,5$ или 50 при пресмятане на ръста в м) и повишена в групата на пациентите, където и делът на жените с патологично отношение талия/ръст има лек превес над тези с нормално отношение. В обобщение на тези данни може да се каже, че преобладават жените с наднормено тегло и затлъстяване в нашата пациентска група и по-важното е, че при тях по-често се установява андроиден тип преразпределение на мастната тъкан, което се наблюдава и в други проучвания [62]. Влияние върху тези резултати може да оказва глобалната тенденция към затлъстяване на населението [342]. Когато се вземе под внимание и известната тясна връзка между синдрома и затлъстяването, можем да предположим, че делът на жените със СПЯ ще се увеличава в бъдеще. Тези тревожни данни подчертават още повече необходимостта от извършване на задълбочена клинична оценка при всяка жена още при поставяне на диагноза СПЯ, включваща и антропометричните показатели - ръст, тегло, обиколка на талия и ханш, изчисляване на индекс на телесна маса, както и отношенията талия/ханш и талия/ръст, които са лесни за изпълнение, евтини и неинвазивни методи за клинична оценка.

Известно, че СПЯ в комбинация със затлъстяване се асоциира с повишен риск за метаболитни и сърдечно-съдови заболявания, които се изявяват предимно в постменопаузална възраст при жената [1]. От друга страна обичайно с напредване на възрастта се наблюдава тенденция към увеличаване теглото [343]. Именно затова е много важно още в млада възраст да се диференцират високорисковите от нискорисковите пациенти и насочи вниманието и терапевтичния ресурс в посока намаляване на тези рискове.

В настоящето проучване клинична оценка на хирзутизма се извърши съгласно съвременните препоръки за диагностика и лечение на СПЯ от 2018 г. [11], според които хирзутизмът се оценява посредством модифицираната скала на Ferriman-Gallwey в 9 андроген-зависими зони [18] и наличието му се потвърждава при скор $\geq 4-6$ [11]. В нашия анализ се заложи гранична стойност на хирзутизма да бъде mFG score ≥ 8 . Съображенията ни за това са две. Първата е, че в препоръките, публикувани от Teede et al. [11], се обръща допълнително внимание на етнически-свързаните вариации в хирзутизма. Обичайно се наблюдава по-тежка изява на андроген-зависимо окосмяване сред жените от Близкия изток, Испания и Средиземноморието, с които ние споделяме фенотипни и генотипни характеристики [344]. Втората е, че в голям обзор на Escobar-Morreale [340] се отбелязва, mFG score ≥ 8 точки следва да се приеме за гранична стойност на хирзутизма при липса на друга ясна граница за съответната популация. В съображение влизат и данните, че във всички предходни анализи, проведени сред българска популация жени със СПЯ, mFG score ≥ 8 точки е определената гранична стойност за хирзутизма [13; 52-57; 123; 143].

Процентът на жените с хирзутизм в нашата кохорта от пациенти е 50,8%, като той остава по-нисък спрямо докладваната от Azziz et al. и Carmina et al. - около 75-80% [345, 346], където хирзутизмът е потвърден при скор $> 5-6$, и също така по-ниска от докладваната от Гатева (72-85%) при заложена гранична стойност на mFG score ≥ 8 [52]. Проведеният ROC анализ със стойностите на mFG score в нашия анализ показва, че най-добър баланс между чувствителност и специфичност се постига при стойности скор = 4,5-5,5 (69,4% срещу 64,9% за 4,5 точки и 62,9% срещу 67,6% за 5,5 точки). При общ скор 6,5 чувствителността намалява на 55,6%, а специфичността се

повишава на 75,7%, докато при скор равен на 8,5 - чувствителността намалява на 43,5%, а специфичността се увеличава на 83,8% в нашия анализ. От друга страна медианата на mFG score в нашия анализ е 4 при здравите контроли, също така и при пациентите със СПЯ от фенотип D, където липсват белези за хиперандрогенизъм, като 75-ия перцентил на interquartile range (IQR) в групите достига до 6,5 и 6 точки, съответно. В обобщение на тези анализи може да заключим, че mFG score $\geq 6,5$ би могъл да бъде надеждна гранична стойност за хирзутизъм при СПЯ в българската популация със задоволителна чувствителност и специфичност и използван за диагностични цели. Бъдещи изследвания сред по-голяма кохорта от пациенти ще потвърди или отхвърли това предположение.

Предиктивната роля на акнето и алопекцията, използвани самостоятелно в диагностиката на СПЯ, е нясна [347, 348]. Допълнително липсва точен инструмент за оценка на акнето [348]. Предвид и по-малката си честота на изява и специфичност, акнето и алопекцията се предполага да имат по-скоро второстепенна роля в диагностиката на клиничния хиперандрогенизъм. В нашата кохорта от пациенти акне се установи сред 22,6% от жените със СПЯ, която е близка до докладваната в други проучвания [1], докато алопекция се установи само при 1,6% от жените в пациентската група.

Най-интересната хипотеза за патогенеза на синдрома е изказана от Frank et al. [201], според която СПЯ е генетично детерминирано овариално нарушение, характеризиращо се със свръхпродукция на андрогени. Експозицията на андрогенен експес през интраутробното развитие на фетуса се смята, че обуславя типичните фоликуларни нарушения и предопределя като цяло клиничната изява на СПЯ в адолесцентна възраст [201, 202]. Най-критичният период за изява на синдрома за уязвимия индивид се счита, че е пубертетът, когато се активира хипоталамо-хипофизо-гонадната ос. В този период се оформят и метаболитните прояви, свързани с преразпределение на мастната тъкан и физиологично се наблюдава повишаване на инсулиновите нива, което от една страна води до намаляване на нивата на SHBG и амплифициране ефектите на циркулиращите андрогени и от друга страна - стимулация на овариална стероидогенеза [207]. При жени със СПЯ се предполага, че

физиологично наблюдаваната хиперинсулинемия в пубертетна възраст може да е тригериращ фактор за последваща поява на хиперандрогенемия и ановулация [207].

В тази връзка възможно е резултатите от нашето проучване, които показват, че при по-голямата част от жените в пациентската група менструалните нарушения датират от менархе (63,6%), да не са случайни и да са обвързани със зародена в пубертетна или дори в интраутробна възраст дисфункция. Възрастта на менархе в нашия анализ е сходна между пациентите и контролите - 12,4 години. Очаквано менструалните нарушения в групата на пациентите са по-често по типа на олиго-аменорея, както показват данните на Azziz et al. [345]. Все пак при 16,2% от здравите контроли (6 жени) има също анамнеза за олиго-аменорея, която в хода на диагностичния процес бе обяснена със съпътстващата хиперинсулинемия и инсулинова резистентност. Близо 50% от жените във всяка от двете групи съобщава за нормална продължителност на менструалното кървене - между 3-4 дни.

В литературата има данни, че преждевременното пубархе (< 8 години) увеличава риска от изява на СПЯ на по-късен етап [349], докато по-скоро пряка връзка между синдрома и възрастта на менархе не се намира, показва нашата литературна справка. Fruzzetti et al. [350] и Zore et al. [351] докладват, че подрастващи и млади възрастни жени не проявяват разлика по отношение на клинични и хормонални характеристики на СПЯ, т.е. с напредване на възрастта клиничната картина не се променя съществено. В тази връзка изследване на Ibáñez et al. показва, че започването на инсулиноочувствяващо лечение още в пубертета има дългосрочни ползи за жените със СПЯ [352]. От друга страна Elting et al. съобщават обратното, че честотата на изява на менструалните нарушения намалява с увеличаването на възрастта [353], което е свързано с промяната в нивата на андрогените [354]. Все пак при 20 до 30% от жените със СПЯ и еуменорея би могло да има данни за олиго-ановулация [20], което е важно да се има предвид при всяка жена със синдрома и насочено да се провежда диагностика за установяване на овулацията, особено сред тези от тях, които планират концепция.

Известно е, че СПЯ е причина за репродуктивни нарушения при около 80% от жените с ановулаторен инфертилитет [70]. Макар репродуктивните нарушения да не

бяха сред водещите причини за това нашите пациенти със СПЯ да се обърнат към ендокринолог, анамнестични данни за инфертилитет сред тях се установи при 12,1%. Този резултат не показва сигнификантна разлика от здравата група, където анамнеза за инфертилитет съобщават да имат 13,5% от контролите. Все пак подробната гинекологична анамнеза сочи, че при всяка една от жените-контроли с анамнеза за инфертилитет са налице данни за мъжки фактор.

При анализа на жените с реализирана бременност в миналото е налице сигнификантна разлика между двете групи. В контролната група анамнеза за реализирана бременност има при 35,1% от жените срещу 17,7% (22/124) от пациентите със СПЯ. По интересен е анализът сред тези жени със синдрома и реализирана бременност в миналото, показващ че сред 45,5% (10/22) от тях е имало анамнеза за инфертилитет. За сравнение в друго изследване докладваната честота за инфертилитет се установява при 66% от жените със СПЯ [355]. При 8 от нашите пациенти бременността е постигната спонтанно, докато при 2 е имало нужда от провеждане на лечение за индукция на овулацията или асистирана репродуктивна терапия. В заключение може да обобщим, че макар данните ни да са сред малка група жени и сведенията за инфертилитет в двойката да са сходни в двете групи, следва да отбележим, че 45,5% от жените с реализирана бременност в пациентската група съобщават за затруднения със зачеването.

5.2. Оценка на качество на живот в групите

Доказано жените със СПЯ имат повишена тревожност и по-изразена склонност към депресии [73]. Водещи фактори, влияещи за появата на тези психологически разстройства сред тях, се счита, че имат хирзутизмът, акнето, затлъстяването и инфертилитета [74-77]. Допълнително хроничният ход на протичане [78-80], комплексната и хетерогенна природа на СПЯ [81, 82] влияят също негативно върху психологическото благополучие на жените със синдрома. Всички тези данни извеждат на преден план необходимостта от оценка на качеството на живот в комплексната клинична оценка на всички пациенти със СПЯ. Това залегна и като препоръка в съвременните ръководства за диагностика и лечение на СПЯ, според

които оценка на качеството на живот следва да се прави при всички жени с тази диагноза изходно и в хода на лечение, като един от препоръчаните инструменти затова е Modified Polycystic Ovary Syndrome health-related quality-of-life Questionnaire (MPCOS-Q) [11]. Доколкото ни е известно, подобен анализ не е извършван за българска популация жени до този момент.

Нашият анализ потвърждава факта, че жените със СПЯ имат по-често нарушено качество на живот от здравите жени, което нагледно се представя чрез сигнификантната разлика в общия скор от въпросника на MPCOS-Q между здрави и пациенти. Анализът поотделно на 7-те домейна сочи, че в домейните **емоционално нарушение** и **регулярност на менструацията** двете групи достигат сигнификантност с най-висок афинитет. Такава се наблюдава и в домейните **хирзутизъм, инфертилитет** и **акне**. Barnard et al. докладва подобни резултати, където сигнификантността между групите е наблюдавана във всеки от седемте домейна [6]. Интересно е, че в нашия анализ сигнификантна разлика между пациенти и здрави не се наблюдава в домейните **телесно тегло** и **менструални симптоми**, което донякъде не е изненадващ резултат. От една страна **менструалните симптоми**, в това число влияние на главоболието, подуването на корема и менструалните болки при последната менструация върху качеството на живот, са неспецифични симптоми и често срещани оплаквания сред голяма част от жените по време на менструация. От друга страна **телесното тегло**, както показват по-горните анализи, е сходно в двете ни групи. И макар жените със затлъстяване да са повече в групата на пациентите, тези с наднормено тегло превалират в контролната група и отчасти изравняват съотношението жени с нормално тегло и жени с нарушение в теглото.

Корелационният анализ показва, че по-ниските резултати в домейните **емоционално нарушение** и **инфертилитет** в MPCOS-Q се дължат на андроген-зависимото окосмяване, оценено чрез mFG score. Влошените резултати в домейн **хирзутизъм** се влияят преди всичко на повишените ИТМ и антропометрични показатели. Очаквано те също влияят негативно и върху възприятията на пациентите със СПЯ по отношение на **телесното тегло**, върху които също така роля оказва и

патологичното окосмяване. Интересна и отчасти необяснима е позитивната корелация, която се установява между домейн *акне*, ИТМ и WHtR. Логично е с покачването на тегло да се влошава акнето, но нашите корелационни анализи подсказват по-скоро, че акнето не е бил определящ фактор за влошеното качество на живот сред пациентите с повишено тегло и отношение талия/ръст. В обобщение пациентите със СПЯ споделят за по-лошо качество на живот спрямо здравите и това в най-голяма степен зависи от нарушената емоционалност, повишеното окосмяване, акнето и репродуктивните нарушения. Антропометричните и клинични параметри, които влияят върху тези резултати, са предимно ИТМ, отношение талия/ръст и хирзутизъм.

5.3. Оценка на сексуалната функция в групите

Жените със СПЯ съобщават за по-изразено сексуално неудовлетворение и по-ниска сексуална самооценка спрямо жените без синдрома. Доказано сексуалната дисфункция влияе значимо върху взаимоотношенията им [356]. Затова в препоръките за диагностика и лечение на СПЯ се включва също провеждането на скрининг за сексуална функция, като Female Sexual Function Index (FSFI) [324] е един от често използваните инструменти за оценка.

Нашият анализ показва, че пациентите и здравите нямат сигнификантна разлика в нивата на общия скор и всеки от домейните на FSFI поотделно, както и че делът на жените със сексуална дисфункция е сходен в двете групи. Подобни резултати се докладват от Egan et al. [357]. Интересно е, че нивата на ИТМ корелират позитивно с три от домейните на въпросника – *желание*, *лубликация* и *болка*, което предполага, че покачването на телесното тегло не е негативен фактор за сексуалността при жената. Тези наши предположения са потвърдени от изследване на Гатева, където се установява, че жените със затлъстяване без СПЯ имат значимо по-рядко сексуална дисфункция отколкото жените със синдрома, независимо от наличието или отсъствието на затлъстяване [52]. Донякъде очакван резултат е този от анализа на данните, показващ че ексцесивното окосмяването влияе негативно върху *възбудата* и *удовлетворението*. Това ни дава основание да предполагаме, че при жените в

голяма степен сексуалната удовлетвореност се влияе от сексуалната самооценка, като всяко нарушение в тази насока оказва негативен ефект както върху възбудата, така и върху цялостните сексуални възприятия.

Тази зависимост се потвърждава и в корелационния анализ между резултатите от двата въпросника за оценка на качество на живот и сексуална функция. Наблюдаваната позитивна връзка между *емоционалното нарушение, хирзутизма, инфертилитета и акнето* и повечето от домейните на FSFI затвърждават нашата хипотеза, че сексуалността при жената е комплексно детерминирана. В заключение нашите анализи върху резултатите от двата въпросника сочат, че в основата на добрата сексуална функция при жените със СПЯ стои предимно добрата сексуална самооценка.

5.4. Анализи във фенотипните групи на СПЯ

Съгласно Ротердамските критерии съществуват 4 фенотипа на СПЯ – фенотип А, В, С и D [10]. Фенотип А и В се назовават още като класически фенотипове и докато фенотип А е т.нар. „завършена“ форма на СПЯ, характеризираща се с трите диагностични компонента (хиперандрогенизъм, олиго-ановулация и поликистозна морфология на яйчниците (ПКМЯ)), при фенотип В отсъстват поликистозните яйчници. Тези два фенотипа са и основните форми на СПЯ, съгласно по-старите критерии - на NIH, САЩ [7]. Обичайно клиничната манифестация при тях е най-богато представена, метаболитните прояви и инсулиновата резистентност са чести и най-изразени. С по-лека клинична картина се характеризира т.нар. овулаторен СПЯ фенотип, презентиращ се само с хиперандрогенизъм и ПКМЯ (фенотип С). При този фенотип рискът от хиперстимулационен овариален синдром е по-висок, а метаболитните прояви са по-умерено представени. Най-лека клинична манифестация по отношение на инсулиновата резистентност и метаболитните прояви се наблюдава при т. нар. нехиперандрогенен СПЯ фенотип, при който хиперандрогенизмът отсъства (фенотип D) [14].

В нашето изследване преобладават пациентите с фенотип А (52%), след което като честота се нареждат фенотип В (26%), фенотип С (13%) и фенотип D (9%). За

разлика от проучването на Пехливанов и Орбецова [13], където в класическите фенотипове преобладават жените със затлъстяване, в нашия анализ групите не показват сигнификантна разлика по отношение на ИТМ и останалите антропометрични показатели. Нещо повече прави впечатление, че процентът на жените със затлъстяване е най-голям във фенотип D и най-малък във фенотип A, докато пациентите с наднормено тегло са представени само в класическите фенотипове. Жените с висцерален тип преразпределение на мастната тъкан с малък превес преобладават във всяка фенотипна група пред тези с гиноиден тип.

Значима разлика между четирите фенотипа на СПЯ се установява по отношение на скалата за оценка на хирзутизма, като медианата на mFG score е сигнификантно най-висока във фенотип C в сравнение с останалите фенотипове. В тази подгрупа е и най-голям дялът на жените с акне, макар да не достигат сигнификантна разлика с другите подгрупи. Докато тези два клинични белега за хиперандрогенизъм преобладават във фенотип C, дерматологичният признак на инсулинова резистентност е най-слабо представен във фенотип C, отново несигнификантно обаче.

В анализа за оценка на качество на живот прави впечатление, че при фенотип C се установява най-значимо нарушение по отношение на домейните *емоционално нарушение*, *хирзутизъм* и *акне*. Единствено по домейн *регулярност на менструацията* фенотип C не проявява нарушение, което е очакван резултат предвид това, че менструалните нарушения не са техен диагностичен критерий. Още по-голям интерес събуждат резултатите от FSFI въпросника във фенотипните групи. Категорично може да се заключи, че жените от фенотип C проявяват в най-голяма степен сексуална дисфункция спрямо другите фенотипове. Това нарушение се установява както в анализа на общия скор, така и при всеки домейн поотделно. В обобщение на всички анализи направени по фенотипни групи стигаме до заключението, че при фенотип C клиничните белези на хиперандрогенизъм са най-изразени и това вероятно допринася за тяхната в най-голяма степен влошена емоционалност и сексуална функция спрямо другите фенотипове.

5.5. Хиперандрогенизъм и изследване на връзката му с клинични и серумни маркери за ранна хрущялна загуба - sCOMP, KOOS въпросник и анализ на ултразвуковите мускулно-скелетния прояви

Доколкото ни е известно, настоящото проучване е първото, оценяващо връзката между хиперандрогенизъм и (пре)остеоартроза на коляното при млади жени със СПЯ, като се фокусира върху ранните симптоми на колянна остеоартроза (КОА), ултразвуковите мускулно-скелетния прояви и изследването на относително надежден биомаркер за разграждане на хрущяла. sCOMP, един от най-изследваните биомаркери, е доказано свързан с диагнозата КОА [358] и нарушенията на колянната става, асоцииращи се с нараняване [359] или със затлъстяване [360]. Освен това има данни, че по-високият изходен sCOMP е свързан с бърза прогресия на разграждането на хрущяла и по-лоша прогноза [361].

В настоящото проучване се установи, че пациентите със СПЯ не се различават значително в серумните нива на COMP от здравите жени. Установи се обаче слаба отрицателна корелация между sCOMP и нивата на тестостерона, която остава значима след контролиране по ИТМ. В светлината на тази констатация се повдигна въпроса: може ли хиперандрогенемията при жени със СПЯ да бъде свързана с по-нисък търновър на хрущяла, тъй като sCOMP отразява дегенерацията на ставите? При мъже андрогените са показали, че предпазват хрущяла от възпалително-индуцирана деградация [362].

Обсервационни и интервенционални проучвания показват, че появата и прогресията на остеоартроза (ОА) при жените значително се влияе от половите хормони [92-95] и това е довело до въвеждането на термина „хормоналнозависима“ остеоартроза [99]. Това твърдение се подкрепя от факта, че при 64% от жените с ОА на колянна става симптомите започват през първите 5 години след менопауза [97]. Има установена корелация между ниските нива на естроген и рентгенови белези за стеснение на колянното пространство (индиректен признак за загуба на хрущял) при жени в постменопаузална възраст [98]. Важно е да се отбележи, че СПЯ не се характеризира обаче с ниски нива на естрогените. Повишеното производство на

андрогени в яйчниците и надбъбречните жлези осигурява достатъчно естроген при ароматизацията им и неговите серумни нива обикновено са нормални или дори повишени [363]. Докато хиперандрогенизмът и нормо-/хиперестренизмът обикновено се наблюдават в репродуктивна възраст, имаща предполагаема положителна роля за здравето на ставите на младите жени със СПЯ, инволюцията на яйчниците и половият хормонален дисбаланс в постменопаузална възраст могат да попречат на защитата на ставите и по този начин да доведат до по-голямо разпространение на ОА. В нашето проучване не се наблюдава корелация между sCOMP и серумните нива на естрадиола; средните нива на естрадиола обаче са в рамките на нормалните лабораторни граници.

Известно е, че жените с СПЯ имат по-често наднормено тегло или затлъстяване, което се потвърждава и в нашето проучване, и инсулинова резистентност [65], за които се предполага, че имат водеща роля в повишеното разпространение на свързаните с възрастта заболявания [45]. Наскоро широкомащабно проучване разкри по-голямо разпространение и ускорена поява на ОА както при натоварени, така и при ненатоварени стави сред пациенти със СПЯ. Независимо от това, сравнението е направено с контроли, съответстващи по възраст, но не и по ИТМ [364]. Интересното е, че нашите данни показват по-изразено нарушение по отношение домейн *симптоми* на KOOS въпросника сред младите пациенти със СПЯ в сравнение със здравите жени. Това не може да се обясни изцяло със затлъстяването и свързаното с него по-голямо натоварване на коляното, тъй като контролите имат подобни демографски и антропометрични характеристики, включително ИТМ. Следователно, пациентите със СПЯ могат да имат оплаквания, свързани с коляното, по-често и тези симптоми могат да доведат до нарушение в ежедневните дейности. От друга страна, лошото самочувствие и нарушеното качество на живот сред жените със СПЯ, което се потвърждава от нашите изследвания и е потвърдено също така от Barnard et al. [6], е възможно отчасти да обясни резултатите от KOOS въпросника. Мащабни проспективни проучвания са необходими, за да се потвърди нашата хипотеза и да се анализира причинно-следствената връзка между СПЯ и оплакванията, свързани с коляното.

В съответствие с две предишни проучвания [108, 365], ние също откриваме значителни разлики в дебелината на хрущяла на изследваните кондили, но само в три от четирите тествани области. Докато изтъняването или загубата на хрущяла е патогномонична характеристика на ОА, значимостта на по-голямата дебелина на хрущяла при млади възрастни остава неясна, тъй като нарастването на височината на хиалинния хрущял може също да означава влошаване на тъканите в най-ранните стадии на ОА [366, 367]. Известно е, че дебелината на хрущяла на коляното варира в зависимост от възрастта и антропометричните характеристики, а именно теглото и височината. Хиперандрогенизмът, основна характеристика на СПЯ, може също да повлияе на метаболизма на хрущяла и да допринесе за по-голямата му дебелина при жените със СПЯ. Независимо от това, нашите резултати разкриват слаба корелация между FAI и една от точките на измерване, която загуби сигнификантността си след контролиране по ИТМ. Многофакторни механизми, различни от хиперандрогенизма, могат да играят водеща роля за по-голямата дебелина на хрущяла при жените със СПЯ, спрямо тази при здравите индивиди.

Ограниченията на настоящото проучване са малкият брой на изследваните жени и кроссекционният дизайн на изследването. Освен това не оценяваме дебелината на хрущяла на всички участници, а на произволно избрани участници от двете групи. На второ място, нашето проучване е по-скоро изследователско и има за цел да постави основите за мащабни проспективни проучвания, които ще ни позволят да оценим причинно-следствената връзка на хиперандрогенизма и КОА. Трябва също да отбележим, че sCOMP може да бъде повишен при няколко условия, различни от КОА [367, 368]. За тази цел изключихме пациенти с възпалителни/автоимунни ревматични заболявания и известни белодробни заболявания, свързани с по-високи нива на sCOMP. Други локализации на ставни симптоми обаче не са взети под внимание.

В заключение младите жени със СПЯ могат да изпитват по-често симптоми, свързани с коляното и нарушения в ежедневните активности, спрямо съответстващи на тях по възраст и ИТМ контроли. Пациентите със СПЯ имат по-голяма дебелина на хрущяла на колянната става в сравнение с контролите. По-ниски серумни нива на

COMP, биомаркер за хрущялен търновър, е възможно да бъдат присъщи за СПЯ пациенти с повишени нива на тестостерона.

5.6. Хиперандрогенизъм и роля на общия и свободен PSA в диагностиката му при СПЯ

PSA е добре познат серумен маркер при мъжете, като чувствителен показател в диагностиката на простатния карцином [26]. Нивата му добре корелират с тези на андрогените при тях [27]. Днес обаче познанията около PSA далеч не се ограничават единствено до диагностика на заболявания при мъжете. PSA се изолира от много тъкани при жените, включително млечни жлези, периуретрално, овариална, ендометриална, слюнчена и тиреоидна тъкан, амниотична течност, кърма, серум, включително и от много тумори [28-30]. Допълнително се доказва, че в млечните жлези и при експериментални модели на клетъчни линии за карцином на млечната жлеза генната експресия за PSA се увеличава под въздействие на андрогените и прогестините [31- 34]. За разлика от тях естрогените косвено контролират нивата на простатния антиген като нарушават андроген-индуцираната PSA синтеза [30]. В светлината на тези данни се повдигна хипотезата за ролята на PSA в диагностиката на хиперандрогенизма при СПЯ [36, 42].

В проучване сред жени със синдрома уринните нива на PSA са били почти 200-пъти по-високи отколкото при здравите контроли [35]. За сравнение в нашето изследване нивата на общ и свободен PSA не показват значима разлика между пациенти със СПЯ и здрави контроли, но все пак сравнението е извършено на базата на анализ на серумни, а не уринни нива на PSA. В друго проучване се установява корелация между двата показателя с нивата на общ и свободен тестостерон сред жените със СПЯ и здравите контроли [42]. Макар, че резултатите от нашето проучване не потвърждават сигнификантна корелация с биохимичните показатели за хиперандрогенизма, слаба такава се наблюдавана с най-специфичния от клиничните белези, а именно mFG score за оценка на хирзутизъм, и потвърждава данните от предходни проучвания посочващи, че жените с хирзутизъм имат значително по-високи нива на PSA [36, 37].

Интересни са резултатите от двата поданализа, показващи че значимо по-високи нива на общ PSA се установяват в групата на жените с клиничен хиперандрогенизъм, спрямо тези без клинични белези за хиперандрогенизъм. Между двете подгрупи обаче, диференцирани спрямо наличието или отсъствието на биохимичен хиперандрогенизъм, нивата на общ и свободен PSA остават сходни. В обобщение нашият анализ не установява разлика в нивата на общ и свободен PSA между пациенти със СПЯ и здрави жени и в този смисъл не се потвърждава ролята им в диагностиката на СПЯ, каквато се установява в други проучвания [36, 37, 42]. Все пак данните ни показват, че серумните нива на общ PSA позитивно отразяват степента на хирзутизъм сред жените със синдрома и показват по-високи нива сред пациентите с клиничен хиперандрогенизъм. Бъдещи изследвания с нови по-чувствителни методики ще позволят да разкрият потенциала на този така добре познат и изследван маркер сред мъжете, но все още по-малко проучен показател при жените.

5.7. Анализ на ендоканабиноидите (анандамид и 2-arachidonoylglycerol)

5.7.1. Изследване на Анандамид (AEA) и SHBG и анализ на връзката им с метаболитните и хормонални характеристики при СПЯ

Ролята на ендоканабиноидната система в етиопатогенезата на СПЯ се предполага на базата на тясната връзка между затлъстяването и синдрома, като тези две състояния се комбинират в 30 до 70% от случаите в зависимост от етническата принадлежност и използваните критерии за диагноза [48, 341, 369]. От друга страна връзката между ендоканабиноидната система и затлъстяването е безспорна, като за това говорят данните от проучванията с първия ендоканабиноид-рецепторен блокер (римонабант) с доказан ефект по отношение на редукцията на тегло [272-276].

Все още не са ясни точните механизми, с които ендоканабиноидната система може да съучаства в патогенезата на СПЯ. Почти всички до момента натрупани данни в литературата предполагат за най-вероятна връзка на ендоканабиноидите с метаболитните нарушения и по-конкретно с инсулиновата резистентност при СПЯ. Известно е, че тя и компенсаторната на нея хиперинсулинемия са едни от най-

доказаните патогенетични механизми при синдрома, в които затлъстяването играе адитивна роля [49].

В тайванско проучване при жени със синдрома е установено, че нивата на ендоканабиноидите (АЕА и 2-arachidonoylglycerol (2-AG)) в периферни мононуклеарни клетки са по-високи спрямо тези при здрави контроли. Двете групи в проучването са показали също сигнификантна разлика по отношение на НОМА-IR, ИРИ на 0 и 120 минута в полза на групата със СПЯ. Допълнително е установена повишена експресия на СВ1R в периферни мононуклеарни клетки и висцерална мастна тъкан сред жените със СПЯ, спрямо здравата популация. Наличието на позитивна корелация между експресията на СВ1 mRNA и нивата на ендоканабиноидите с тези на кръвната захар и ИРИ на втория час в хода на ОГТТ дава основание на авторите да стигнат до заключението, че ендоканабиноидната система е тясно свързана с инсулиновата резистентност при СПЯ и по-конкретно СВ1R е единственият фактор, независимо асоцииращ се с нея [294].

В друго проучване китайски изследователи са установили, че нивата на fatty acid amide hydrolase (ФААН, ензимът отговорен за разграждането на АЕА) при жените със СПЯ са значимо по-ниски във всяка фаза на менструалния цикъл, спрямо жените без СПЯ. Установена е и сигнификантна позитивна корелация между инсулиновата резистентност (оценявана посредством QUICKI) и експресията на ФААН в пролиферативна и секреторна фаза на менструалния цикъл в групата със СПЯ. Това дава основания на авторите да предполагат, че ФААН играе роля в генезата на инсулиновата резистентност при СПЯ [295].

В друго лонгитудинално проучване на същия авторски колектив се установяват по-високи изходни плазмени нива на АЕА при жени със СПЯ, сравнени с жени без СПЯ, но с инфертилитет. Ефектите, които са наблюдавани след 3-месечно комбинирано лечение с етинил естрадиол 35 мкг и ципротерон ацетат 2 мг в комбинация с метформин при жените със СПЯ, са били редуциране на нивата на АЕА и повишаване нивата на експресия на ФААН в ендометриума [296].

За разлика от изброените проучвания резултатите от нашето изследване не показват значими различия в нивата на АЕА между здрави и пациенти със СПЯ. Това

от части може да се обясни с факта, че двете групи нямат сигнификантна разлика и по отношение на всички метаболитни показатели, антропометрични данни и нивата на SHBG. В дизайна на проучването е заложено групите да бъдат сходни по ИТМ и възраст. От друга страна двете групи се различават значимо както по ЛХ/ФСХ отношението, така и по отношение на всички маркери за хиперандрогенизъм, който е задължителен диагностичен компонент съгласно диагностичните критерии на АЕ-PCOS [8]. В корелационния анализ сред пациентите със СПЯ се установи сигнификантна негативна корелация между нивата на АЕА и WHR, както и с нивата на кръвната захар на 120 минута. На базата на тези резултати можем да заключим, че макар инсулиновата резистентност да е предполагаем водещ патогенетичен механизъм в генезата на СПЯ, вероятно в нашата кохорта от пациенти превес имат някои от другите предполагаеми патофизиологични механизми. В подкрепа на тази хипотеза са данните, показващи че при необезните жени, при които не се установява инсулинова резистентност, се предполагат предимно невроендокринни нарушения като водещ патогенетичен механизъм [210].

Доколкото ни е известно, в последните 5 години проведените изследвания в областта на ендоканабиноидната система при СПЯ са ограничени само до азиатска популация, като само в две от тях са изследвани техните лиганди – АЕА и 2-AG [294, 296]. В повечето от тях проучванията на ендоканабиноидната система включват изследване на СВ1, СВ2-рецепторите и/или FAAH и връзката им с инсулиновата резистентност е отнесена именно към тях.

Данните обаче за взаимоотношенията между отделните фактори – рецептор, лиганд, ензим на разграждане в литературата са противоречиви. В проучване сред постменопаузални жени със затлъстяване установената връзка между повишени циркулиращи нива на ендоканабиноидите и понижената генна експресия на СВ1-рецептори в мастната тъкан на същите пациенти предполага, че между лиганд-рецептор съществува негативна обратна регулация [356]. В друго изследване, индуцираното с диета затлъстяване е довело до намаляване на броя на СВ1-рецепторите в екстрахипоталамични региони от мозъка на плъхове, но не и в хипоталамуса [370]. В едно от проучванията, описани по-горе, сред жените със СПЯ

е отчетено едновременно повишение в нивата (изследвани в периферни мононуклеарни клетки) на двата ендоканабиноида – АЕА и 2-AG, както и повишение в експресията на СВ1-рецептори в същите клетки и в мастната тъкан [294], което е в противоречие с по-рано предположената негативна обратна регулация. Възможно е тези различия в данните да се дължат на особености в методологията на двете изследвания, но е възможно също те да се дължат на особености в регулацията на системата. Вероятно тя е различна на централно и периферно ниво. В тази регулация е възможно допълнително да имат отношение други фактори, принадлежащи към ендоканабиноидната система, като адипоцитокени и/или хормони от гастроинтестиналния тракт.

Известно е, че мастната тъкан е голям ендокринен орган, в който протичат множество метаболитни процеси. Тя играе важна роля в етиопатогенезата на инсулиновата резистентност. Висцералната мастна тъкан е метаболитно по-активна от подкожната. По тази причина андронидният тип затлъстяване се асоциира с по-висок риск от инсулинова резистентност, сърдечно-съдови заболявания, развитие на захарен диабет и метаболитен синдром спрямо гиноидния тип. В подкрепа на това твърдение са данните, които показват, че обиколката на талията и отношението талия/ханш са по-надеждни индикатори за повишен метаболитен риск от ИТМ [371].

Въз основа на тези факти, решихме да проведем поданализ. Използвайки рутинен в клиничната практика показател за диференциране на андронидно от гиноидно преразпределение на мастната тъкан, ние разделихме пациентите със СПЯ спрямо тяхното отношение талия/ханш на две групи – СПЯ с андрониден и гиноиден тип. По отношение на повечето клинични, антропометрични и метаболитни показатели очаквано се установи сигнификантна разлика с по-високи нива при андронидния тип, докато SHBG остана значимо по-висок в групата на СПЯ с гиноиден тип. Сигнификантна разлика в групите се установи и по отношение на АЕА, като изненадващи за нас са резултатите, че нивата на ендоканабиноида са по-високи в групата на СПЯ с гиноиден тип преразпределение на мастната тъкан. Тези резултати и данните от корелационния анализ са в противоречие с общоприетата взаимовръзка

между затлъстяването, инсулиновата резистентност и активираната ендоканабиноидна система.

Патофизиологично е трудно да се обясни сигнификантността в нивата на АЕА сред жените със СПЯ и гиноиден тип преразпределение на мастната тъкан. Възможните обяснения за това са само хипотези, като една от тях е, че тук влияние може да оказват външни за системата фактори, като лептин и/или различни микро- и макронутриенти в диетата. В подкрепа на тази идея са и данните, че лептинът [249] и грелинът [272] участват в регулацията на ендоканабиноидната система. Подобна взаимовръзка се предполага в проучване, проведено сред жени с хранителни разстройства, разделени в три групи - *anorexia nervosa* (AN), *binge-eating disorders* (BED) и *bulimia nervosa* (BN). В него се установява, че нивата на АЕА са били сигнификантно по-високи при жени с AN и BED, спрямо такива с BN и здрави контроли. В групата с AN и здравите контроли се установява негативна корелация с нивата на лептина. Заключениета на авторите са, че нарушенията в летиновите нива или сигнали влияят върху получените резултати в нивата на АЕА в двете групи – AN и BED, но не и в групата на BN. Авторите не изключват възможността различни микро- и макронутриенти в приетата храна да оказват влияние върху нивата на АЕА в групите (както това е наблюдавано при изследвания с животни) [373]. Бъдещи изследвания, включващи комплексно изследване на нивата на лептина, CB1R и CB2R и FAAH сред групите би дало отговори на многото възникнали въпроси в резултат на нашето изследване.

Съществува добре документирана връзка между SHBG и инсулиновата резистентност [374], която се потвърждава и в нашето изследване. SHBG показва негативна корелация с повечето от метаболитните параметри, най-силна с ИРИ на 120 минута, и с почти всички антропометрични данни. След разделянето на пациентската група на две подгрупи спрямо техния ИТМ – СПЯ със и без затлъстяване, се установи сигнификантна разлика при повечето от метаболитните показатели (най-силна с инсулиновите нива на гладно и HOMA-IR), както и в нивата на SHBG, но не и при тези на АЕА. В обобщение на резултатите от този поданализ може да се заключи, че нивата на АЕА остават сходни между жени с и без затлъстяване и СПЯ, докато нивата

на SHBG в голяма степен се влияят от наличието на инсулинова резистентност и затлъстяване.

Доколкото ни е известно нашето проучване изследва за първи път серумните нива на АЕА при жени от кавказката раса посредством широко използван и достъпен метод за анализ, а именно – ELISA. Той е посочван, като възможен начин за изследване на ендоканабиноидите [297], но по-утвърден и използван метод в повечето научни проучвания на ендоканабиноидната система е течната хроматография с тандем маспектрометрия [375]. Бъдещи изследвания посредством този високочувствителен и скъп метод за анализ и сравняване с данните от ELISA би ни дало информация дали ELISA е надеждна методика за изследване на ендоканабиноидни лиганди.

Участието на ендоканабиноидната система в репродуктивната функция на жената [237, 279-282] хвърля друга светлина върху системата, различна от метаболитните ѝ ефекти. Изказана е хипотеза, че ендоканабиноидната система може да има връзка с нарушенията на хипоталамо-хипофизо-гонадната ос и променената пулсативност в секрецията на гонадотропин рилийзинг хормон (ГнРХ) при СПЯ. Те могат да се повлияят благоприятно от терапия с СВ1-рецепторен антагонист [283]. В нашето проучване не се установи корелация между нивата на АЕА и някой от изследваните хормони. Вероятно по-точна оценка на ролята на ендоканабиноидите в овариалната функция и интраовариалните патогенетични механизми при СПЯ може да се направи чрез изследване на нивата им във фоликуларна течност.

Ограничения на настоящето изследване са малкият брой изследвани лица и липсата на детайлен анализ на останалите компоненти, участващи в сложната регулация на ендоканабиноидната система. Бъдещи изследвания, включващи и други представители на системата, адипоцитокени и фоликуларни нива на ендоканабиноидите сред по-голяма група пациенти със СПЯ са необходими да се проведат, за да дадат отговор на много въпроси, оставащи отворени, относно тази сложна система.

В заключение нивата на изследвания ендоканабиноид АЕА са сходни при здрави и пациенти, но те показват съществени различия според разпределението на мастната тъкан при СПЯ. Установената корелация с постпрандиалната кръвна захар загатва все пак за ролята на АЕА в сложната взаимовръзка на ендоканабиноидната система с метаболитните промени при синдрома. Потвърди се връзката на SHBG с инсулиновата резистентност и затлъстяването при СПЯ.

5.7.2. Анализ на серумните нива на 2-arachidonoylglycerol (2-AG) при СПЯ в контекста на хормоналните и метаболитни нарушения и сред класическите фенотипове

Както стана ясно в предходния анализ, ендоканабиноидната система участва в метаболитния контрол и в регулиранията на множество физиологични процеси в женския репродуктивен тракт. И докато проучванията с АЕА в известна степен потвърждават неговата връзка с метаболитните промени, включително и в нашия анализ, 2-AG остава слабо проучен биомаркер и ролята му в патогенезата на СПЯ е все още неизвестна. Целта на нашето проучване е да намери отговор на въпроса: може ли 2-AG да участва в хормоналните и метаболитни промени и най-често срещаните характеристики на СПЯ като овулаторна дисфункция и поликистозна морфология на яйчниците (ПКМЯ)?

Доколкото ни е известно има само две проучвания, изследващи нива на 2-AG сред жени със СПЯ, и резултатите от тях са напълно противоречиви. Juan et al. [294] съобщават за повишени нива на 2-AG при инсулин-резистентни жени със СПЯ в сравнение със здрави контроли, докато в проучването на Cui et al. [296] нивата му не са показали сигнификантна разлика между жени със или без СПЯ. Резултатите от нашето проучване показват, че нивата на 2-AG са сходни между пациенти и съответстващи им по възраст и ИТМ здрави контроли. Освен това нашите групи имат сходни антропометрични характеристики и метаболитни параметри, а серумните нива на 2-AG не корелират с нито един измерен метаболитен параметър, свързан с инсулиновата резистентност. Въпреки че се предполага, че ендоканабиноидите могат да повлияят функцията на яйчниците чрез модулиране на механизми, участващи в

енергийния баланс и метаболитния контрол, можем да предположим, че по-скоро 2-AG е слабо свързан с метаболитна дисфункция при СПЯ.

Има достатъчно много данни в литературата показващи, че ендоканабиноидната система играе важна роля в регулацията на много репродуктивни процеси като фоликулогенеза, овулация, имплантиране на ембриона, ранна бременност и раждане [238, 280, 282, 376, 377]. Всички елементи на системата са локализирани и измерени в различни репродуктивни течности, клетки и тъкани като човешки серум, фоликуларна течност, яйчници, матка и плацента [280, 282, 378]. Установи се също, че ендоканабиноидите са под хормонален контрол от оста хипоталамус-хипофиза-яйчник (ХХЯ) и нивата им варират по време на менструалния цикъл [282, 377]. По-високите нива във фоликуларна фаза и пикът по време на овулацията предполагат, че за нормалното протичане на фоликулогенезата и овулацията са необходими повишени нива на ендоканабиноидите [282]. Нещо повече връзката между нарушената експресия на ендоканабиноидите и нарушената фоликулогенеза, съзряването на овоцитите и съответно намаления фертилитет е вече потвърдена [379].

Овулаторната дисфункция е често срещано нарушение при СПЯ, което прави синдрома основна причина за ановулаторен инфертилитет [380]. От друга страна, фоликуларният арест, увеличеният обем на яйчниците и нарушеното съзряване на овоцитите обикновено характеризират ПКМЯ – един от диагностичните компоненти при СПЯ. Всички тези факти повдигат въпроса: възможно ли нарушената ендоканабиноидна секреция да се асоциира с овулаторната дисфункция и поликистозната морфология на яйчниците при СПЯ?

Затова от съществен интерес за нас е анализът на нивата на 2-AG в различните фенотипове СПЯ. Както се отбеляза по-горе фенотип А и В често се посочват като „класически“ СПЯ. Единствената разлика между тях е наличието на ПКМЯ, която във фенотип В не е представена. Непараметричният *post-hoc* анализ показва, че фенотип В има значително по-високи нива на 2-AG в сравнение с фенотип А. Интересното е, че нивата на 2-AG в контролната група също са по-високи от тези във фенотип А. Сравнявайки фенотип В и контролната група, нивата на 2-AG са сходни. Въз основа

на тези резултати можем да предположим, че нивата на ендоканабиноида не могат да бъдат диагностични маркери за СПЯ, както и, че серумните нива на 2-AG не са свързани с олиго-ановулацията при СПЯ, но най-вероятно по-високите нива на 2-AG са необходими за нормалния фоликуларен растеж и биха могли да играят протективна роля в оформянето на поликистозна структура на яйчниците. Доколкото ни е известно нашето проучване изследва за първи път нивата на този ендоканабиноид сред класическите фенотипове на СПЯ и в светлината на свързаните със синдрома олиго-ановулация и ПКМЯ.

Допълнително интересни са данните, показващи че съотношението ЛХ/ФСХ е значително по-високо в групата на фенотип А, но не и при фенотип В при сравняването им със здравите контроли. Въпреки, че съотношението ЛХ/ФСХ не е диагностичен параметър при СПЯ, то е показателно за наличие на нарушение в регулацията на оста ХХЯ. Предвид това, че ендоканабиноидите са под хормонален контрол от ХХЯ-оста, можем да предположим, че нарушената регулация в нея допринася за намалените нива на 2-AG в тази група. В подкрепа на тази хипотеза са също данните за наличие на негативна корелация между ендоканабиноида и ЛХ/ФСХ отношението. За разлика от 2-AG, другият ендоканабиноид (АЕА) не показва сигнификантна хормонална корелация, както и с нивата на 2-AG. В обобщение на анализите от двата ендоканабиноида може да предположим, че докато АЕА се асоциира повече с метаболитните прояви при СПЯ, 2-AG показва повече връзка с неметаболитните прояви на синдрома и предполага по-скоро неговата нарушена секреция или активност да повлиява нормалните фоликуларни процеси в яйчника.

Наскоро публикувано проучване на Kamnate et al. установява, че диацилглицерол липаза β , чрез производството на 2-AG, участва в посттранскрипционната регулация на първичните овоцити в постнатални мишки [381]. Тези открития допълнително хвърлят светлина върху участието на 2-AG във физиологичната регулация на яйчниците и ролята му в нормалния растеж на овоцитите. Като се има предвид нашата хипотеза, че по-ниските нива на 2-AG могат да бъдат свързани с нарушен фоликуларен растеж и образуване на ПКМЯ, бъдещи

изследвания, измерващи нивата на 2-AG във фоликуларна течност, са необходими за потвърждаване или опровергаване на тази хипотеза.

Ограниченията в нашето проучване са малкият брой изследвани пациенти и контроли и крос-секционният дизайн на изследването. Допълнително, ние не анализирахме всички фенотипове на СПЯ, а само двете класически форми. Бъдещи проучвания сред по-голяма група от жени със СПЯ, представени в четирите фенотипа и измерване на нивата на 2-AG във фоликуларна течност ще ни позволи да оценим причинно-следствената връзка между системата, ПКМЯ и овулаторната дисфункция - да развие или опровергае нашите наблюдения.

Вярваме, че настоящото проучване е първото, което изследва серумните нива на 2-AG сред жени, използвайки широко използвания и достъпен ELISA метод, предложен като потенциална алтернатива за анализ на ендоканабиноиди [297]. Като се има предвид, че течната хроматография с тандемна маспектрометрия (LC/MS) остава златен стандарт за тестване на нивата на ендоканабиноидите [375], допълнителни проучвания с или без съчетани измервания на LC/MS и ELISA са оправдани за сравняване на тези два метода за количествено определяне на нивата на ендоканабиноидите.

В заключение серумните нива на 2-AG са сходни между пациентите със СПЯ и здравите контроли. Независимо от това, пациентите със СПЯ и ПКМЯ имат значително по-ниски нива на ендоканабиноида, спрямо пациентите без поликистозни яйчници и контролите. Взети заедно тези резултати предполагат, че серумните нива на 2-AG не са диагностичен маркер за СПЯ, въпреки това тяхната променена секреция или активност може да повлияе на нормалните фоликуларни процеси в яйчника.

5.8. Анализ на цитокини, адипокини и миокини при пациенти със СПЯ и здрави контроли

5.8.1. Серумни нива на IL-18 при пациенти със СПЯ – анализ на връзката им с индекси за инсулинова резистентност, генерализирано и висцерално затлъстяване

Асоциираните метаболитни нарушения, наблюдавани при жените със СПЯ, несъмнено са свързани с хронично нискостепенно възпаление. Дали обаче СПЯ *per se* е възпалително състояние или докладваната връзка между синдрома и нискостепенното възпаление се дължи на т. нар. замъгляващи фактори (confounding factors)? Настоящото проучване има за цел да отговори на този въпрос чрез сравняване на нивата на IL-18, като мощен провъзпалителен биомаркер, при пациенти със СПЯ и здрави контроли. Освен това в настоящето проучване определяме променливите, които независимо предсказват нивата на IL-18 при пациенти със СПЯ.

Нашето изследване не установи разлика в нивата на IL-18 между пациенти със СПЯ и здрави контроли. Както във всички анализи досега двете групи са съпоставени по възраст и ИТМ, които вероятно предопределят сходните стойности на повечето метаболитни параметри. За разлика от тях, пациентите със СПЯ са по-хиперандрогенни и също по-хирзутни от контролите.

Клиничните проучвания, изследващи връзката между СПЯ *per se* и IL-18, съобщават противоречиви резултати. Някои от тези проучвания показват, че СПЯ независимо от затлъстяването се свързва с повишени нива на IL-18 [138-140]. Кауа et al. [382] обаче демонстрират, че затлъстяването определя нивата на IL-18 при жените със СПЯ и съответно предопределя значимостта на разликата в нивата му между пациентите и контролите. Същото проучване показва, че жените със затлъстяване и СПЯ и здравите контроли със затлъстяване имат сходни нива на IL-18. В друго проучване на Lindholm et al. [383] се демонстрира също липса на значимост в нивата на IL-18 сред трите групи в техния анализ: слаби жени със СПЯ, жени с наднормено тегло и СПЯ и контроли с наднормено тегло. По-интересното е, че при анализиране на mRNA за възпалителни маркери (включително IL-18) в мастната тъкан, авторите

не наблюдават разлики между пациентите с наднормено тегло и контролите с наднормено тегло, но във всеки случай и при двете групи възпалителните маркери остават по-високи в сравнение със слабите пациенти със СПЯ [383]. Подобна липса на пряка връзка между СПЯ и IL-18 беше по-рано предположена, тъй като и синдрома, и повишените нива на интерлевкина са поотделно свързани със затлъстяването, а то играе ролята на замъгляващ фактор между тях. В съответствие с последните проучвания, в които нивата на IL-18 са повишени при участниците със затлъстяване, ние откриваме подобни резултати [138, 140, 382, 383]. В трите изследвани групи (всички участници, здрави контроли и група на СПЯ) жените с наднормено тегло/затлъстяване имат значително по-високи нива на IL-18 от жените с нормално тегло. Важно е също да се отбележи, че наличието или липсата на СПЯ не повлиява нивата на IL-18 нито при участниците с наднормено тегло/затлъстяване, нито при слабите от тях.

За да се изясни напълно каква е връзката между възпалението и СПЯ, проучването има за цел от една страна да допринесе към настоящите познания, както и да погледне от различен ъгъл на сложната взаимовръзка, като вземе предвид по-нататък в анализа съответните маркери за глобално и централно затлъстяване, инсулинова резистентност и хиперандрогенизъм. Важно е да се отбележи, че резултатите от нашето проучване по-скоро подкрепят хипотезата, че връзката между СПЯ и повишените нива на IL-18 зависи от замъгляващи фактори като затлъстяване и инсулинова резистентност, които влияят на нивата на цитокина и водят до нискостепенно възпаление при синдрома. Подобно на предишни изследвания в областта [384], ние потвърждаваме, че нивата на IL-18 са по-високи при пациенти със СПЯ и инсулинова резистентност (ИР), спрямо тези без ИР. В нашето проучване обаче по-голям интерес предизвика изследването на пациенти със СПЯ, разделени на подгрупи според WHtR и FAI, използвайки клинично значими гранични стойности. Доколкото ни е известно подобни анализи се извършват за първи път в световен мащаб. WHtR е ефективен маркер за диференциране на ниско от високорисковите метаболитни и сърдечно-съдови профили [68, 328]. От друга страна андрогенният ексцес е асоцииран вече с влошен метаболитен профил [208], а FAI е релевантен

параметър за оценка на хиперандрогенизма. Резултатите от нашите два субанализа с WHtR и FAI показват, че нивата на IL-18 са значително по-високи при пациентите с висцерално затлъстяване и хиперандрогенизъм. По-нататъшни проучвания трябва да оценят ролята на IL-18 като предразполагащ фактор за повишен сърдечно-съдов и допълнителен метаболитен риск при пациенти със СПЯ.

Данните ни сочат също, че нивата на IL-18 корелират положително с няколко индекса за генерализирано и висцерално затлъстяване и повечето от метаболитните параметри, свързани с ИР в групата на СПЯ. Въпреки че пациентите с хиперандрогенизъм имат по-високи нива на IL-18 от тези с нормални андрогенни нива, само хирзутизмът показва слаба корелация с нивата на изследвания интерлевкин. Тези резултати и установената връзка между IL-18 и влошения метаболитен профил предполагат, че по-скоро висцералното затлъстяване и инсулиновата резистентност предразполагат към повишеното възпаление сред пациентите със СПЯ, а не толкова хиперандрогенизмът. В множествения регресионен анализ се видя, че приблизително 50% от вариациите в нивата на IL-18 се обясняват с възрастта, обиколката на талията и инсулинемия на гладно.

Ограниченията на нашето изследване са относително малкият брой изследвани лица, както и неговият крос-секционен дизайн. Допълнително не можем да определим дали съществува причинно-следствена връзка между нивата на IL-18 и метаболитния и сърдечно-съдов риск при жените със СПЯ, за което са необходими по-мощни, проспективни, лонгитудинални проучвания.

В заключение може да отбележим, че в нашето проучване нивата на IL-18 остават сходни сред пациенти със СПЯ и здрави контроли. Въпреки това нивата на интерлевкина показват връзка с няколко индекса за генерализирано и висцерално затлъстяване и инсулинова резистентност в групата на СПЯ, където възрастта, обиколката на талията и инсулинемията на гладно определят в най-голяма степен серумните нива на този провъзпалителен биомаркер.

5.8.2. Адипокини

Metrn1 се секретира от белите адипоцити, активираните моноцити и макрофаги [156] и скелетната мускулатура [157], поради което днес се класифицира още като адипо-миокин. В мастната тъкан секрецията му се индуцира при студова експозиция, а в скелетната мускулатура при физическо натоварване, показва изследване при мишки [157]. Metrn1 играе важна роля в мускулната регенерация [385] и във възстановяването на сърдечния мускул под въздействие на токсични или други нокси [386, 387]. Той увеличава енергийния разход и подобрява инсулиновата чувствителност, индуцирайки експресията на гени, свързани с термогенезата и покафеняването на бялата мастна тъкан, както и със синтеза на анти-инфламаторни цитокини при мишки [157]. Това откритие създава хипотезата, че Metrn1 е възможно да играе роля в патофизиологичните процеси на метаболитните заболявания, в това число и на захарния диабет тип 2.

Резултатите от публикуваните до момента проучвания показват обаче противоречиви резултати. Lee et al. [158] и Zheng et al. [159] съобщават за по-ниски серумни нива на Metrn1 при пациенти с новодиагностициран ЗД тип 2, докато Chung et al. [160] и AlKhairi et al. [388] установяват повишени серумни нива на Metrn1 при пациенти със захарен диабет тип 2.

При СПЯ ролята на Metrn1 е още по-малко проучена и неясна. До този момент има само едно проучване, изследващо нивата на адипо-миокина сред жени със синдрома. Резултатите от изследването показват, че нивата му са били сигнификантно по-ниски сред жените със СПЯ, спрямо здравите контроли. Metrn1 негативно е корелирал с нивата на инсулина и кръвната захар на гладно сред СПЯ групата и позитивно с ИТМ, нивата на адипонектина и хомоцистеина в контролната група [163].

Нашите резултати са противоположни на данните от това проучване, изследващо Metrn1 сред жени със СПЯ. В нашия анализ нивата на адипо-миокина не показват сигнификантна разлика между изследваните групи – пациенти със СПЯ и здрави контроли. По-интересни са данните от анализа при стратифициране на участниците според ИТМ на група с нормално тегло и група с наднормено тегло/затлъстяване. Нивата на Metrn1 са сигнификантно по-високи сред жените с

наднормено тегло/затлъстяване спрямо тези с нормално тегло както сред всички участници, така и в пациентската група. Подобни данни се докладват от AlKhairi et al. [388], които установяват по-високи серумни нива на Metrnl сред участниците със затлъстяване. Допълнително те установяват сигнификантна разлика в нивата на адипо-миокина при пациенти със затлъстяване и захарен диабет тип 2 спрямо незатлъстелите диабетици. В контролната група обаче значима разлика между участниците със и без затлъстяване не се установява. В нашия анализ сред здравата група също не установяваме разлика в нивата на Metrnl между жени с нормално тегло и жени с наднормено тегло/затлъстяване.

Интересно е, че резултатите с Metrnl се доближават до тези, които получаваме в изследването на IL-18 в групите стратифицирани по ИТМ. Единствената разлика, която наблюдаваме е, че в здравата група разлика в нивата на адипо-миокина не се установява между жените с нормално тегло и тези с наднормено тегло/затлъстяване. Въз основа на тези данни можем да предположим, че нивата на Metrnl при СПЯ зависят в известна степен от телесното тегло, като нашият анализ показва, че те са по-високи при жените с наднормено тегло или затлъстяването, но вероятно други фактори повлияват нивата му в по-значима степен.

Резултати от предклинични проучвания на ефектите на Metrnl върху мастната тъкан при мишки показват, че експресията му от адипоцити може да увеличи чувствителността към инсулин чрез стимулиране на peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) рецепторите [161]. От друга страна, свръхекспресията на Metrnl има обратните ефекти - намалява липогенезата и инхибира експресията на PPAR γ в човешките адипоцити, с което е възможно да доведе до хиперинсулинемия и инсулинова резистентност [162]. Всъщност резултатите на Löffler et al. [162] в изследване при деца опровергават наблюдаваната при мишки асоциация между Metrnl и повишената термогенеза и покафеняването на мастната тъкан. В своя обширен анализ изследователите установяват, че адипо-миокинът не се асоциира с експресията на гени свързани с покафеняването на мастната тъкан и допълнително установяват, че Metrnl инхибира адипоцитната диференциация, увеличава хипертрофията на адипоцитите и вторично води до хиперинсулинемия [162]. На

практика тези резултати опровергават представените по-рано анти-инфламаторни и анти-метаболически ефекти на Metrn1, като свързват установената му свръхекспресия в адипоцити при деца със затлъстяване с последващите клинични наблюдения на ИТМ-независимо асоциирана хиперинсулинемия и възпаление в мастната тъкан при хора.

В светлината на тези резултати може да заключим, че нашето изследване наблюдава подобна клинична връзка между повишените нива на Metrn1, висцералното затлъстяване, инсулиновата резистентност, хиперинсулинемията и провъзпалителния фактор (IL-18). В подкрепа на това са първо данните ни от анализите на адипо-миокина в подгрупите, стратифицирани според WHtR и според наличието или липсата на ИР. И в двата анализа нивата на Metrn1 остават сигнификантно по-високи сред жените със СПЯ и висцерален тип затлъстяване спрямо тези с гиноидният тип, както и сред тези от тях с ИР в сравнение с пациентите без ИР.

В корелационния анализ се потвърждава връзката между висцералния тип затлъстяване и влошения метаболитен профил с повишените нива на Metrn1. Наблюдава се позитивна корелация с ИТМ и повечето от антропометричните показатели в групата на СПЯ, както и с нивата на кръвната захар и инсулина на гладно, и с НОМА-IR съответно. Интересно е също, че нивата на Metrn1 корелират позитивно с IL-18, който е доказан проинфламаторен биомаркер [389]. Сигнификантна негативна корелация се наблюдава единствено със SHBG, което е очаквана асоциация. Това се дължи от една страна поради добре известната неблагоприятна връзка между SHBG и ИР [374], а от друга – поради негативната асоциацията с висцералния тип затлъстяване, документирана и в нашите анализи.

В множествения регресионен анализ се установи, че възрастта, ИТМ и НОМА-IR обясняват едва 33% от вариациите в Metrn1, но от тях само НОМА-IR допринася за статистическата значимост на модела.

Въпреки че Zhang et al. [154] докладват значително повишени нива на адипокина зонулин сред жени със СПЯ в сравнение с контролите и демонстрират силна корелация с инсулиновата резистентност, затлъстяването, дислипидемията и тежестта на менструалните нарушения при СПЯ, спекулирайки че нарушеният

пермеабилитет на червата може да играе роля в патофизиологията на СПЯ, ние не установяваме подобни резултати. Изследванията със зонулин не показват нито разлика в нивата му между двете групи – здрави и пациенти със СПЯ, нито значими корелации от допълнителните анализи. Въз основа на получените данни и подобно на резултатите на Cetin et al. [155] можем да заключим, че зонулин не е надежден диагностичен маркер при жени със СПЯ.

В заключение може да обобщим, че Metrn1 и зонулин не могат да бъдат диагностични маркери на СПЯ. Въпреки това нашият анализ установява ясна връзка между повишените нива на Metrn1 и няколко индекса за генерализирано и висцерално затлъстяване, инсулинова резистентност и проинфламаторния маркер – IL-18. Взети заедно тези резултати предполагат, че повишените нива на Metrn1 се асоциират повече с проинфламаторни и метаболитни нарушения при СПЯ. Допълнителни проучвания с адипо-миокина са необходими сред жени със синдрома, за да се оценят комплексно неговите метаболитни ефекти.

5.8.3. Миокини

СПЯ е репродуктивно-метаболитно нарушение, при което освен хиперандрогенизъм и олиго-ановулация се установява повишен риск от захарен диабет тип 2, изява на метаболитен синдром, сърдечно-съдови заболявания и други. Участието на скелетната мускулатура в контрола на метаболитните процеси е без съмнение, благодарение на откритието на секретирани от тях миокини и нарастващия брой изследвания в последните години с тях. Проучванията показват, че миокините иризин, мионектин, IL-13 и IL-15, са безспорно ангажирани в метаболизма на глюкозата и липидите по автокринни, паракринни и ендокринни механизми [165]. Предполага се, че посредством контракциите се осъществяват секреторните функции на скелетните мускули и така вероятно се проявяват здравословните ефекти на физическата активност [167].

Участието на миокините в патогенезата на СПЯ обаче остава все още слабо проучена област. Резултатите с най-изследвания миокин – иризин в областта на синдрома са много противоположни в отделните анализи. Повечето проучвания

докладват повишени нива на иризин при пациенти със СПЯ спрямо здрави контроли [390-393], според други - нивата са сходни [394, 395], а според трети те са по-ниски при пациентите със синдрома [396] отколкото при здравите. Предполагаема е ролята на затлъстяването като замъгляващ фактор за повишените нива на иризин, а в мета-анализ се показва, че серумните нива на иризин при жени със СПЯ са повишени независимо от наличието на инсулиновата резистентност [397].

Мионектинът е може би вторият по честота изследван миокин, хомоложен по структура на адипонектина, който се експресира и секретира предимно от мускулните тъкани, а плазмените му нива подлежат на метаболитен контрол [168]. В областта на СПЯ, на този етап, в литературата се намират само три проучвания, изследващи нивата на миокина сред жени със синдрома и данните от тях са също противоречиви. В две от проучванията нивата на мионектина са били значително по-ниски при пациенти със СПЯ в сравнение със здрави контроли [171, 398], докато в третото нивата на миокина са били значимо по-високи сред жените със синдрома спрямо здрави [399].

В нашия анализ мионектин показва тенденция към по-ниски серумни нива в пациентската група спрямо контролите, без да се достига статистически значима разлика. Въпреки че в част от предходните проучвания се наблюдава негативна корелация между мионектин и ИТМ, инсулиновата резистентност, триглицеридите и андрогените (FAI, общ тестостерон) и позитивна връзка със SHBG и HDL-C [171, 398], ние не установяваме наличие на значима корелация с нито един метаболитен, антропометричен или хормонален показател. Наблюдаваната единствена позитивна корелация с малко проучения адипокин зонулин не би могла на този етап да бъде интерпретирана. Зонулин е наскоро открит адипокин, аналог на произвеждания от *Vibrio cholera* - *Zonula occludens* токсин, и участва в регулацията на пропускливостта на червата. В литературата резултатите с него при СПЯ са също противоречиви, докато в нашето проучване не се откри разлика в нивата му между двете групи, както и някаква връзка с изследваните други параметри. Необходими са още изследвания сред по-голям брой участници, за да може да се направи по-пълнен и точен анализ на

взаимовръзките между мастна тъкан и скелетна мускулатура и съответно адипокини-миокини в патогенезата на СПЯ.

Доколкото ни е известно нашето проучване изследва за пръв път серумните нива на IL-15 при пациенти със СПЯ в контекста на метаболитните нарушения. Анализът ни установява, че пациентите със СПЯ имат значимо по-ниски серумни нива на IL-15 спрямо здравите контроли. Съгласно ROC анализа серумни нива на IL-15 над 23,5 pg/mL би могло да диференцират здрави от пациенти със СПЯ с чувствителност и специфичност 62-63%.

Като част от семейството на миокините IL-15 се експресира силно в скелетните мускули, но се произвежда също и от много други клетки и тъкани в тялото [172]. Секретираният от скелетните мускули IL-15 повлиява процесите в мастната тъкан, където стимулира редукцията на мастна маса и тегло, потиска адипогенезата и така намалява нивата триглицеридите и VLDL-холестерола в кръвта [173], главно чрез UCP и PPAR- δ сигнални пътища [174]. Всички тези ефекти са наблюдавани при опити с животни третирани с рекомбинантен IL-15 при липса на промяна в калорийния прием [174, 178, 400-402]. Допълнително е установено, че IL-15 има роля в метаболизма на липидите в мастната тъкан, включващ инхибиране на липопротеин-липазната активност, усвояването на липиди и липогенезата, и също така роля в насърчаването на липолизата, окислението на свободните мастни киселини и термогенезата [400, 403, 404]. Очевидно IL-15 функционира като един антиобезигенен фактор [405] и по-конкретно ефектите му са насочени към висцералната мастна тъкан.

Резултати от изследвания при хора сочат, че плазмените нива на IL-15 са значително намалени при хора със затлъстяване [177] и отрицателно са корелирали с мастната маса [178]. За разлика от тях ние не установяваме значима връзка между нивата на IL-15 и ИТМ, както и с другите антропометрични параметри. Нещо повече при разделяне на пациентката група според ИТМ на подгрупи с нормално тегло и наднормено тегло/затлъстяване не се установи значима разлика в нивата на IL-15. Все пак при разделянето на СПЯ групата според WHR на подгрупи с нормално WHR (<

0,85) и повишено WHR ($\geq 0,85$) анализът показва тенденция към по-ниски серумни нива сред жените с повишено съотношение талия/ханш.

В корелационния анализ допълнително се наблюдава негативна корелация между нивата на IL-15 и WHR. Взети заедно тези данни ни карат да предполагаме, че висцералният тип затлъстяване при СПЯ се асоциира с понижени серумни нива на IL-15. Все пак вземайки предвид фактът, че нашите две групи – пациенти със синдрома и здрави контроли, не се различават сигнификатно по показателя WHR, можем да предполагаме, че е възможно и други фактори да влияят върху понижените серумни нива на миокина в пациентската група.

Изследвания при плъхове показват, че експресията на IL-15 се повишава след 12 седмична прогресивна тренировка, което се е съпътствало и с подобрене на глюкозната толерантност в мускулите [406]. От нашите анализи до момента знаем, че жените със СПЯ имат нарушено качество на живот. От друга страна физическата активност доказано се свързва с повишена мотивация, добро настроение и подобрене в качеството на живот [407], което ни кара да предполагаме, че може би нашите пациенти не водят редовно физическа активност. Разбира се това са само спекулации, защото в нашия анализ физическата активност на участниците не бе подробно снета и анализирана като част от анамнезата. Бъдещи изследвания на миокина сред здрави жени и пациенти със СПЯ, съпоставени според нивото на физическата им активност може да даде отговор на въпроса - дали серумните нива на IL-15 се влияят от спортната активност при хора.

Благоприятната роля на миокина в превенцията на затлъстяването включва също ефектите му върху глюкозната хомеостаза и инсулиновата резистентност. В скелетните мускули и черния дроб IL-15 може да подобри инсулиновата чувствителност [175], благодарение на редуциране нивата на кръвната захар на гладно и намаляване на инсулиновите нива. Тези ефекти са съпроводени с покачване 1,8 пъти на mRNA експресията на глюкозен транспортер 4 (GLUT4) в мускулите и намаляване на експресията в черния дроб на mRNA на Pdk4 (ключов ген, участващ в инхибицията на глюкозната оксидация), фосфоенолпируват карбоксикиназата и глюкозо-6-фосфат, ген ангажиран в чернодробната глюконеогенеза, при третирани

мишки с хидродинамична доставка на плазмид, съдържащ IL-15 ген [173]. Подобни ефекти са наблюдавани също при IL-15/sIL-15 Ra – третиран мишки със затлъстяване [402], докато в друго изследване отново сред мишки със затлъстяване, третиран с Ad-експрециращ вектор на човешки IL-15, се наблюдава значително подобрение на глюкозните нива и инсулиновата резистентност, но при липса на повлияване на инсулинемията на гладно и инсулиновата секреция от остро прилаганата IL-15-терапия [175].

Обобщено тези резултати от изследвания при опитни животни показват, че IL-15 има благоприятни ефекти върху глюкозния метаболизъм, като подобрява гликемията и инсулинова резистентност, благодарение на ефектите си свързани с увеличаване на глюкозно усвояване в мускулите и намаляване на глюкозната чернодробна продукция.

В подкрепа на тези благоприятни ефекти върху глюкозната хомеостаза говорят и резултатите от нашия корелационен анализ, в който наблюдаваме негативна връзка между IL-15 и нивата на кръвната захар и инсулина на първия и втория час в хода на ОГТТ. Интересно обаче е, че нивата на гликемията и инсулина на гладно, и НОМА-IR съответно не показват значима връзка с тези на миокина. Очевидно понижените серумни IL-15 нива се асоциират предимно с постпрандиална хипергликемия и хиперинсулинемия и значително по-малко с нивата им на гладно.

Връзката между IL-15 и чревния микробиом е вече установена, като има данни, че суплементация с IL-15 води до намаляване на липидната абсорция сред плъхове [408], а абсорбцията на макронутриети се влияе от чревната бактериална композиция. В този смисъл възниква въпроса: възможно ли е гастроинтестинални фактори да влияят допълнително на нивата на миокина и затова да не се установява връзка между инсулина и глюкозата на гладно в нашия анализ, а такава да е налице в хода на ОГТТ след поглъщане на 75 г глюкоза? Възможен отговор на този въпрос вероятно би се получил след проследяване на нивата на IL-15 заедно с тези на инсулина и глюкозата в хода на ОГТТ. Необходими са още изследвания сред жени със СПЯ, които да развият или отхвърлят нашите предположения.

От изложеното до тук можем да направим извода, че IL-15 повлиява глюкозната хомеостаза, като понижените му нива се асоциират с хипергликемия, хиперинсулинемия, инсулинова резистентност и висцерален тип затлъстяване. Вероятно всички тези фактори влияят върху по-ниските нива на миокина сред жените със СПЯ спрямо контролите в нашия анализ, но все пак не се изключва допълнително участието и на други фактори като намалената физическа активност или чревния микробиом например да влияят допълнително върху тях.

В края на нашия анализ на миокините ще се спрем на резултатите с третия изследван миокин brain-derived neurotrophic factor (BDNF), който е член от семейството на невротрофичните фактори, синтезира се от скелетните мускули [179] и проявява благоприятни ефекти върху въглехидратната [182-185] и мастната обмяна [181], но също така се счита, че играе важна роля и във фоликулогенезата и овогенезата [186-189], като физиологичен регулатор на нормалното фоликуларно зреене [190]. Нашите резултати не показват сигнификантна разлика в нивата на BDNF между здрави и пациенти със СПЯ, въпреки че все пак има тенденция нивата да са по-високи сред жените със синдрома. За разлика от нашите резултати в проучване, проведено сред жени със СПЯ и здрави контроли, пациентите със СПЯ са имали сигнификантно по-високи нива на невротрофина спрямо здравите контроли. Хипотезата на авторите е, че повишението им е свързано с повишеното съотношение ЛХ/ФСХ при жените със СПЯ, като вероятно високите нива на ЛХ повишават и секрецията на BDNF от гранулозните клетки [196]. Подобна връзка в нашия анализ не се установява и ние не можем да предполагаме подобна зависимост. В заключение на данните от нашите изследвания - серумните нива на BDNF не могат да бъдат диагностичен маркер за СПЯ.

Ограниченията на настоящото проучване са малкият брой на изследваните жени и кроссекционният дизайн на изследването. Нашето проучване е по-скоро изследователско и има за цел да постави основите за по-мощни проспективни проучвания, включително и анализи, които ще ни позволят да оценим причинно-следствената връзка между IL-15, диагнозата СПЯ и наблюдаваните метаболитни нарушения при синдрома.

В заключение на всички анализи с миокини, серумните нива на мионектин и BDNF остават сходни между пациенти със СПЯ и здрави контроли и не показват значима връзка с метаболитните и хормонални промени сред жените със синдрома. Серумните нива IL-15 са значимо по-ниски сред пациентите със СПЯ в сравнение със здравите. Нивата на миокина показват негативна връзка с хипергликемията, хиперинсулинемията, инсулиновата резистентност и висцералния тип затлъстяване. IL-15 е възможен диагностичен маркер при СПЯ. Необходимо е провеждането на повече изследвания сред жени със синдрома, за да се постигне по-комплексна оценка на причинно-следствената връзка между миокина и СПЯ.

6. ИЗВОДИ

1. Извършването на комплексна клинична оценка посредством достъпни и неинвазивни диагностични инструменти като антропометричните показатели позволява диференцирането на високорискови от нискорискови за метаболитни нарушения пациенти.

2. Пациентите със СПЯ страдат от по-лошо качество на живот спрямо здравите жени, влияние върху което в най-голяма степен оказват нарушената емоционалност, повишеното окосмяване, акнето и репродуктивните нарушения. Съвкупността от тези фактори влияе негативно върху сексуалната им функция.

3. Пациентите със СПЯ се характеризират с по-голяма дебелина на феморалния хрущял на колянната става. Хиперандрогенизмът е възможно да играе протективна роля върху ставния хрущял сред жени със синдрома.

4. Серумните нива на общ PSA позитивно отразяват степента на хирзутизъм сред жените със синдрома и показват по-високи нива в групата с клиничен хиперандрогенизъм, но не и с биохимичен.

5. Серумните нива на ендоканабиноида АЕА показват връзка с метаболитните прояви при СПЯ, докато 2-AG – предимно с неметаболитните. Нарушената секреция или активност на 2-AG е възможно да повлиява нормалните фоликуларни процеси в яйчника.

6. Повишените серумни нива на IL-18 и Metrnl се асоциират с наличието на генерализирано и висцерално затлъстяване и инсулинова резистентност при пациентите със СПЯ. Възрастта, обиколката на талията и инсулинемията на гладно определят в най-голяма степен нивата на IL-18, докато НОМА-IR – на Metrnl.

7. Понижените серумни нива на миокина IL-15 при СПЯ се асоциират с хипергликемия, хиперинсулинемия, инсулинова резистентност и висцерален тип затлъстяване.

7. ПРИНОСИ

Приоритетни научно-теоретични с международна значимост:

1. Оценена е връзката между хиперандрогенизъм и (пре)остеоартроза на коляното при млади жени със СПЯ чрез изследване на ранни симптоми на гонартроза, ултразвукови показатели и надежден биомаркер за хрущялен търновър.

2. Изследвани са серумни нива на ендоканабиноидите АЕА и 2-AG при пациенти със СПЯ от кавказка раса. Анализирани са сред класическите фенотипове на СПЯ и в светлината на свързаните със синдрома олиго-ановулация и поликистозна морфология на яйчниците.

3. Проведена е оценка на серумните нива на IL-18 при пациенти със СПЯ, стратифицирани съгласно клинично-значими и ефективни параметри за диференциране на ниско- от високорискови профили за метаболитни и сърдечно-съдови нарушения.

4. Изследвани са серумните нива на IL-15 сред пациенти със СПЯ в контекста на метаболитните нарушения на синдрома.

Приоритетно научно-теоретични с национална значимост:

1. Извърши се оценка на качеството на живот посредством модифицираната версия на специализирания въпросник за оценка на качество на живот сред жени със СПЯ - Modified Polycystic Ovary Syndrome health-related quality-of-life Questionnaire (MPCOS-Q).

2. Проведе се анализ на нивата на общ и свободен PSA в контекста на хиперандрогенизма при СПЯ.

С потвърдителен характер:

1. Изследваните антропометрични показатели позволяват лесното диференциране на пациентите със СПЯ на високорискови и нискорискови по отношение на метаболитните нарушения.

2. Потвърди се, че пациентите със СПЯ страдат от по-лошо качество на живот в сравнение със здравите жени.

3. Потвърди се връзката на SHBG с инсулиновата резистентност и затлъстяването при СПЯ.

С приложен характер:

1. Оцени се качеството на живот и сексуалната функция в отделните фенотипове на СПЯ.

2. Проведе се изследване на серумните нива на ендоканабиноидите АЕА и 2-АГ посредством широко използван и достъпен метод за анализ ELISA.

3. Оцени се диагностичния потенциал на IL-15 за разграничаване на пациенти със СПЯ от здрави жени.

8. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Статии – 6

Статии в международни списания, индексирани в WoS (Общ IF = 14,22):

1. **Kabakchieva P**, Gateva A, Hristova J, Georgiev T, Kamenov Z. Analysis of 2-Arachidonoylglycerol Levels in Polycystic Ovary Syndrome in the Context of Hormonal and Metabolic Alterations and Across the Classical Phenotypes. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2022. doi: 10.1089/can.2021.0183. (**Q1, IF = 4,786**)

2. **Kabakchieva P**, Georgiev T, Gateva A, Hristova J, Kamenov Z. Polycystic ovary syndrome and (pre)osteoarthritis: assessing the link between hyperandrogenism in young women and cartilage oligomeric matrix protein as a marker of cartilage breakdown. *Clin Rheumatol.* 2021; 40(10): 4217-4223. doi: 10.1007/s10067-021-05753-0. (**Q2, IF = 3,65**).

3. **Kabakchieva P**, Gateva A, Velikova T, Georgiev T, Kamenov Z. Anandamide is associated with waist-to-hip ratio but not with body mass index in women with polycystic ovary syndrome. *Minerva Endocrinol (Torino).* 2022. doi: 10.23736/S2724-6507.21.03336-4. (**Q3, IF = 3,757**)

4. **Kabakchieva P**, Gateva A, Velikova T, Georgiev T, Yamanishi K, Okamura H, Kamenov Z. Elevated levels of interleukin-18 are associated with several indices of general and visceral adiposity and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Arch Endocrinol Metab.* 2022; 66(1): 3-11. doi: 10.20945/2359-3997000000442. (**Q3, IF = 2,03**)

Статии в български списания:

1. **Кабакчиева П**, Каменов З. Синдромът на поликистозните яйчници – най-честата ендокринна патология при жените в репродуктивна възраст. *GP News.* 2018; 19(8): 5-11.

2. **Кабакчиева П**, Гатева А, Каменов З. Ендоканабиноидна система – ролята ѝ в метаболизма и фертилитета. *Ендокринология.* 2020; 25(2): 73-82.

Участие в международни научни конгреси с постер/резюме – 3

1. **Kabakchieva P**, Georgiev T, Gateva A, Kamenov Z. Assessment of knee-related symptoms, activities, and quality of life in patients with polycystic ovary syndrome. Annual European Congress of Rheumatology EULAR, 2-5 June, 2021. Ann Rheum Dis. 2021; Abstract book: Ab0591, pp:1332-1333. (**Q1, IF = 16.1**).

2. **Kabakchieva P**, Gateva A, Velikova T, Georgiev T, Kamenov Z. Serum levels of endocannabinoids in patients with polycystic ovary syndrome and comparison with healthy controls. 19th International Congress of Endocrinology, 24-28 February, 2021; Abstract/poster: ICE2021-1618.

3. **Kabakchieva P**, Gateva A, Velikova T, Georgiev T, Yamanishi K, Okamura H, Kamenov Z. Interleukin-18 linked to anthropometric, biochemical and metabolic markers of visceral adiposity and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. 18th Annual Meeting of Androgen Excess & PCOS Society, November 7, 2020; Abstract book: pp: 50.

Участия в научни проекти - 4

1. **Грант 2019** на МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ - Проект с вх. № 8302/21.11.2018 г (Договор № Д-102/23.04.2019 г.) на тема „Роля на ендоканабиноидната система в метаболитните и хормоналните нарушения при синдром на поликистозните яйчници“ с ръководител д-р Антоанета Трифонова Гатева, д.м. и базова организация УМБАЛ “Александровска“ ЕАД.

2. **Млад изследовател 2020** на МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ - Проект с вх. № 8378/20.11.2019 г. (Договор № Д - 85/24.06.2020 г.) на тема „Хиперандрогенизъм при синдром на поликистозни яйчници и изследване на връзката му с PSA и серумни маркери за ранна хрущялна загуба“ – с изпълнител (докторант) д-р Пламена Петрова Кабакчиева-Георгиева и научен ръководител

проф. д-р Здравко Асенов Каменов, д.м.н. и базова организация УМБАЛ “Александровска“ ЕАД.

3. **Грант 2020** на МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ – Проект с вх. № 8379/20.11.2019 г. (Договор № Д-130/24.06.2020 г.) на тема „Маркери за овариална дисфункция при синдром на поликистозни яйчници“ с ръководител доц. д-р Антоанета Трифонова Гатева, д.м. и базова организация УМБАЛ “Александровска“ ЕАД.

4. **Грант 2021** на МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ - Проект с вх. № 7944/19.11.2019 г. (Договор № Д-113/04.06.2021 г.) на тема „Роля на висцералната мастна тъкан и скелетната мускулатура в патогенезата на синдрома на поликистозни яйчници“ с ръководител доц. д-р Антоанета Трифонова Гатева, д.м. и базова организация УМБАЛ “Александровска“ ЕАД.

БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven JS, Legro RS, et al. Polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16057.
2. Stepto NK, Cassar S, Joham AE, Hutchison SK, Harrison CL, Goldstein RF, Teede HJ. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulaemic clamp. *Hum Reprod*. 2013;28(3):777-84.
3. Hameed I, Masoodi SR, Mir SA, Nabi M, Ghazanfar K, Ganai BA. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J Diabetes*. 2015;6(4):598-612.
4. Pedrinelli R, Dell'Omo G, Di Bello V, Pellegrini G, Pucci L, Del Prato S, Penno G. Low-grade inflammation and microalbuminuria in hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(12):2414-9.
5. Roos N, Kieler H, Sahlin L, Ekman-Ordeberg G, Falconer H, Stephansson O. Risk of adverse pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome: population based cohort study. *BMJ*. 2011;343:d6309.
6. Barnard L, Ferriday D, Guenther N, Strauss B, Balen AH, Dye L. Quality of life and psychological well being in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2007;22(8):2279-86.
7. Zawadzki J, Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR. Current issues in endocrinology and metabolism: polycystic ovary syndrome. 1992.
8. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Androgen Excess, Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess Society guideline, *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2006;91(11):4237-4245.
9. Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2016;106(1):6-15.
10. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*. 2004;19(1):41-7.
11. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2018;33(9):1602-18.
12. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(12):4565-92.
13. Pehlivanov B, Orbetzova M. Characteristics of different phenotypes of polycystic ovary syndrome in a Bulgarian population. *Gynecol Endocrinol* 2007;23 (10):604-609.
14. Escobar-Morreale, H. F. Reproductive endocrinology: Menstrual dysfunction — a proxy for insulin resistance in PCOS? *Nat. Rev. Endocrinol*. 2014;10, 10-11.
15. Escobar-Morreale HF, Carmina E, Dewailly D, Gambineri A, Kelestimur F, Moghetti P, et al. Epidemiology, diagnosis and management of hirsutism: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update*. 2012;18(2):146-70.
16. Goodman NF, Cobin RH, Futterweit W, Glueck JS, Legro RS, Carmina E, et al. American association of clinical endocrinologists, american college of endocrinology, and Androgen Excess and PCOS Society disease state clinical review: guide to the best practices in the evaluation and treatment of polycystic ovary syndrome--part 1. *Endocr pract*. 2015;21(11):1291-300.

17. Knochenhauer E, Hines G, Conway-Myers B, Azziz R. Examination of the chin or lower abdomen only for the prediction of hirsutism. *Fertil Steril* 2000;74:980–3.
18. Yildiz BO, Bolour S, Woods K, Moore A, Azziz R. Visually scoring hirsutism. *Hum Reprod Update* 2010;16:51–64.
19. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair in women. *J Clin Endocrinol Meta* 1961;21:1440–7.
20. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009;91(2):456-88.
21. Carmina E, Oberfield SE, Lobo RA. The diagnosis of polycystic ovary syndrome in adolescents. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;203(3):201.e1-5.
22. Goodman NF, Bledsoe MB, Cobin RH, Futterweit W, Goldzieher JW, Petak SM, et al. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for the clinical practice for the diagnosis and treatment of hyperandrogenic disorders. *Endocr Pract*. 2001;7(2):120-34.
23. Каменов З, Орбецова М, Гатева А. Синдром на поликистозните яйчници. София, 2010. ISBN: 978-954-9369-17-5.
24. 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.
25. Ibáñez L, Ong KK, López-Bermejo A, Dunger DB, de Zegher F. Hyperinsulinaemic androgen excess in adolescent girls. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:499–508.
26. Diamandis EP. Prostate-specific Antigen: Its Usefulness in Clinical Medicine. *Trends Endocrinol Metab*. 1998;9(8):310-6.
27. Porcaro AB, Caruso B, Terrin A, De Luyk N, Cacciamani G, Corsi P, et al. The preoperative serum ratio of total prostate specific antigen (PSA) to free testosterone (FT), PSA/FT index ratio, and prostate cancer. Results in 220 patients undergoing radical prostatectomy. *Arch Ital Urol Androl*. 2016;88(1):17-22.
28. Diamandis EP, Yu H. Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. *Urol Clin North Am*. 1997;24(2):275-82.
29. Black MH, Diamandis EP. The diagnostic and prognostic utility of prostate-specific antigen for diseases of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2000;59(1):1-14.
30. Kamenov Z, Todorova M, Khristov V. Prostate-specific antigen (PSA) in women. *Vutr Boles*. 2001;33(1):40-7.
31. Yu H, Diamandis EP, Zarghami N, Grass L. Induction of prostate specific antigen production by steroids and tamoxifen in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 1994;32(3):291-300.
32. Cleutjens KB, van der Korput HA, van Eekelen CC, van Rooij HC, Faber PW, Trapman J. An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Mol Endocrinol*. 1997;11(2):148-61.
33. Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO, Trapman J. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem*. 1996;271(11):6379-88.
34. Yu H, Diamandis EP, Monne M, Croce CM. Oral contraceptive-induced expression of prostate-specific antigen in the female breast. *J Biol Chem*. 1995;270(12):
35. Obiezu CV, Scorilas A, Magklara A, Thornton MH, Wang CY, Stanczyk FZ, et al. Prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 are markedly elevated in urine of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(4):1558-61.

36. Vural B, Ozkan S, Bodur H. Is prostate-specific antigen a potential new marker of androgen excess in polycystic ovary syndrome? *J Obstet Gynaecol Res.* 2007;33(2):166-73.
37. Bahceci M, Bilge M, Tuzcu A, Tuzcu S, Bahceci S. Serum prostate specific antigen levels in women with polycystic ovary syndrome and the effect of flutamide+desogestrel/ethinyl estradiol combination. *J Endocrinol Invest.* 2004;27(4):353-6.
38. Obiezu CV, Giltay EJ, Magklara A, Scorilas A, Gooren LJ, Yu H, et al. Serum and urinary prostate-specific antigen and urinary human glandular kallikrein concentrations are significantly increased after testosterone administration in female-to-male transsexuals. *Clin Chem.* 2000;46(6 Pt 1):859-62.
39. Slagter MH, Scorilas A, Gooren LJ, de Ronde W, Soosaipillai A, Giltay EJ, et al. Effect of testosterone administration on serum and urine kallikrein concentrations in female-to-male transsexuals. *Clin Chem.* 2006;52(8):1546-51.
40. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res.* 1991;51(1):222-6.
41. Lilja H, Christensson A, Dahlén U, Matikainen MT, Nilsson O, Pettersson K, et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clin Chem.* 1991;37(9):1618-25.
42. Diamandis EP, Stanczyk FZ, Wheeler S, Mathew A, Stengelin M, Nikolenko G, Glezer EN, Brown MD, Zheng Y, Chen YH, Wu HL, Azziz R. Serum complexed and free prostate-specific antigen (PSA) for the diagnosis of the polycystic ovarian syndrome (PCOS). *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(11):1789-1797.
43. Lathi RB, Swiersz L, Basina M, Giudice LC. The endometrium in polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2002;9(6),480-485.
44. Томова А, Робева Р, Куманов Ф, Механджиев Цв, Кирилов Г. Антимюлеровият хормон у жени със синдром на поликистичните яйчници. *Съвременна медицина, LVIII, 2007,5-6,26-31.*
45. Gateva A, Kamenov Z. Cardiovascular Risk Factors in Bulgarian Patients with Polycystic Ovary Syndrome and/or Obesity. *Obstet Gynecol Int.* 2012;2012:306347.
46. Belenkaia LV, Lazareva LM, Walker W, Lizneva DV, Suturina LV. Criteria, phenotypes and prevalence of polycystic ovary syndrome. *Minerva Ginecol.* 2019;71(3):211-223. {
47. Каменов З, Коларов Г. Значение на наднорменото тегло и затлъстяването при асистираните репродуктивни техники. *репродуктивно здраве.* 2006; 12:20-25.
48. Yildiz BO, Knochenhauer ES, Azziz R. Impact of obesity on the risk for polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(1):162-8.
49. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev.* 2012;33(6):981-1030.
50. Azziz R. Polycystic Ovary Syndrome. *Obstet Gynecol.* 2018;132(2):321-336.
51. Zore T, Joshi NV, Lizneva D, Azziz R. PCOS: long term health consequences. *Semin Reprod Med* 2017;35:271–81.
52. Gateva A. (2013): Сърдечно-съдов риск при синдром на поликистозните яйчници, Дис. Медицински университет – София. http://cml.mu-sofia.bg:8080/jspui/bitstream/10861/596/1/Antoaneta_Gateva-dis.pdf.
53. Gateva A, Kamenov Z, Tsakova A. NT-proBNP levels in premenopausal women with polycystic ovarian syndrome and/or obesity. *J Obstet Gynaecol.* 2013;33(8):868-72.

54. Gateva A, Kamenov Z, Tsakova A. MCP-1 and fetuin A levels in patients with PCOS and/or obesity before and after metformin treatment. *Central European Journal of Medicine*. 2013;8(5):679-84.
55. Gateva AT, Velikova TV, Kamenov ZA. Peroxiredoxin 4 levels in patients with PCOS and/or obesity. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2019;48(9):739-743.
56. Gateva A, Tsakova A, Hristova J, Kamenov Z. Fibroblast growth factor 23 and 25(OH)D levels are related to abdominal obesity and cardiovascular risk in patients with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2020;36(5):402-405.
57. Tsakova AD, Gateva AT, Kamenov ZA. 25 (OH) vitamin D levels in premenopausal women with polycystic ovary syndrome and/or obesity. *Int J Vitam Nutr Res*. 2012;82(6):399-404.
58. Helvacı N, Karabulut E, Demir AU, Yildiz BO. Polycystic ovary syndrome and the risk of obstructive sleep apnea: a meta-analysis and review of the literature. *Endocr Connect*. 2017;6:437–45.
59. Gateva, A., Kamenov, Z., Ts, M., Bilyukov, R., & Georgiev, O. Polycystic ovarian syndrome and obstructive sleep apnea. *Akusherstvo i ginekologija*. 2013;52(3), 63-68.
60. Gateva A, Kamenov Z, Mondeshki T, Bilyukov R, Georgiev O. Obstructive sleep apnea in Bulgarian patients with polycystic ovarian syndrome. In 15th European Congress of Endocrinology 2013 Apr 1 (Vol. 32). BioScientifica.
61. Gambineri A, Laudisio D, Marocco C, Radellini S, Colao A, Savastano S. Female infertility: which role for obesity? *Int J Obes Suppl* 2019;9(1):65-72.
62. Pasquali R, Gambineri A, Pagotto U. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG*. 2006;113(10):1148-59.
63. Pasquali R, Vicennati V, Pagotto U. Endocrine determinants of fat distribution. In: *Handbook of obesity*. CRC Press. 2003;pp 687-708.
64. Kirschner MA, Samojlik E, Drejka M, Szmalec E, Schneider G, Ertel N. Androgen-estrogen metabolism in women with upper body versus lower body obesity. *Int J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70(2):473-479.
65. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Rel Metab Disord* 2002;26(7):883–96.
66. Romero-Corral A, Somers VK, Sierra-Johnson J, Jensen MD, Thomas RJ, Squires RW, et al. Diagnostic performance of body mass index to detect obesity in patients with coronary artery disease *Eur Heart J*. 2007;28(17):2087-2093.
67. Coutinho T, Goel K, de Sá DC, Kragelund C, Kanaya AM, Zeller M, et al. Central obesity and survival in subjects with coronary artery disease: a systematic review of the literature and collaborative analysis with individual subject data. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(19):1877-1886.
68. Gateva AT, Kamenov ZA. Markers of visceral obesity and cardiovascular risk in patients with polycystic ovarian syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;164(2):161-6.
69. Gateva A, Kamenov Z. Anthropometric indices of visceral obesity and cardiovascular risk factors in patients with polycystic ovarian syndrome. In *Endocrine Abstracts 2012 May 1* (Vol. 29). BioScientifica.
70. Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2008;23(3):462-77.
71. de Wilde MA, Lamain-de Ruyter M, Veltman-Verhulst SM, Kwee A, Laven JS, Lambalk CB, et al. Increased rates of complications in singleton pregnancies of women previously

- diagnosed with polycystic ovary syndrome predominantly in the hyperandrogenic phenotype. *Fertil Steril* 2017;108:333–40.
72. Dumesic DA, Lobo RA. Cancer risk and PCOS. *Steroids*. 2013;78(8):782-5.
 73. Dokras A, Stener-Victorin E, Yildiz BO, Li R, Ottey S, Shah D, et al. Androgen Excess-Polycystic Ovary Syndrome Society: position statement on depression, anxiety, quality of life, and eating disorders in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2018;109(5):888-899.
 74. Benson S, Hahn S, Tan S, Mann K, Janssen OE, Schedlowski M, et al. Prevalence and implications of anxiety in polycystic ovary syndrome: results of an internet-based survey in Germany. *Hum Reprod*. 2009;24(6):1446-51.
 75. Deeks AA, Gibson-Helm ME, Teede HJ. Anxiety and depression in polycystic ovary syndrome: a comprehensive investigation. *Fertil Steril*. 2010;93(7):2421-3.
 76. Hahn S, Janssen OE, Tan S, Pleger K, Mann K, Schedlowski M, et al. Clinical and psychological correlates of quality-of-life in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2005;153(6):853-60.
 77. Kerchner A, Lester W, Stuart SP, Dokras A. Risk of depression and other mental health disorders in women with polycystic ovary syndrome: a longitudinal study. *Fertil Steril*. 2009;91(1):207-12.
 78. Brydon L, Magid K, Steptoe A. Platelets, coronary heart disease, and stress. *Brain Behav Immun*. 2006;20(2):113-9.
 79. Lustman PJ, Anderson RJ, Freedland KE, de Groot M, Carney RM, Clouse RE. Depression and poor glycemic control: a meta-analytic review of the literature. *Diabetes Care*. 2000;23(7):934-42.
 80. Roy-Byrne PP, Davidson KW, Kessler RC, Asmundson GJ, Goodwin RD, Kubzansky L, et al. Anxiety disorders and comorbid medical illness. *Gen Hosp Psychiatry*. 2008;30(3):208-25.
 81. Avery JC, Braunack-Mayer AJ. The information needs of women diagnosed with Polycystic Ovarian Syndrome--implications for treatment and health outcomes. *BMC Womens Health*. 2007;7:9.
 82. Kitzinger C, Willmott J. 'The thief of womanhood': women's experience of polycystic ovarian syndrome. *Soc Sci Med*. 2002;54(3):349-61.
 83. Cesta CE, Månsson M, Palm C, Lichtenstein P, Iliadou AN, Landén M. Polycystic ovary syndrome and psychiatric disorders: Co-morbidity and heritability in a nationwide Swedish cohort. *Psychoneuroendocrinology*. 2016;73:196-203.
 84. Månsson M, Holte J, Landin-Wilhelmsen K, Dahlgren E, Johansson A, Landén M. Women with polycystic ovary syndrome are often depressed or anxious--a case control study. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(8):1132-8.
 85. Fairburn CG, Harrison PJ. Eating disorders. *Lancet*. 2003;361(9355):407-16.
 86. Hollinrake E, Abreu A, Maifeld M, Van Voorhis BJ, Dokras A. Increased risk of depressive disorders in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2007;87(6):1369-76.
 87. Karacan E, Caglar GS, Gürsoy AY, Yilmaz MB. Body satisfaction and eating attitudes among girls and young women with and without polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2014;27(2):72-7.
 88. Lee I, Cooney LG, Saini S, Smith ME, Sammel MD, Allison KC, Dokras A. Increased risk of disordered eating in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2017;107(3):796-802.
 89. Terzieva DD, Orbetzova MM, Mitkov MD, Mateva NG. Serum melatonin in women with polycystic ovary syndrome. *Folia medica*. 2013;55(2):10.
 90. Angin P, Yoldemir T, Atasayan K. Quality of life among infertile PCOS patients. *Arch Gynecol Obstet*. 2019;300(2):461-467.

91. Cronin L, Guyatt G, Griffith L, Wong E, Azziz R, Futterweit W, et al. Development of a health-related quality-of-life questionnaire (PCOSQ) for women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(6):1976-87.
92. Sowers MR, McConnell D, Jannausch M, Buyuktur AG, Hochberg M, Jamadar DA. Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54:2481-7.
93. Valdes AM, Van Oene M, Hart DJ, Surdulescu GL, Loughlin J, Doherty M, et al. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis Rheum* 2006; 54:533-9.
94. Jin SY, Hong SJ, Yang HI, Park SD, Yoo MC, Lee HJ, et al. Estrogen receptor-alpha gene haplotype is associated with primary knee osteoarthritis in Korean population. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R415-21.
95. Cooper C, Egger P, Coggon D, Hart DJ, Masud T, Cicuttini F, et al. Generalized osteoarthritis in women: pattern of joint involvement and approaches to definition for epidemiological studies. *J Rheumatol* 1996; 23:1938.
96. Szoek CE, Cicuttini FM, Guthrie JR, Clark MS, Dennerstein L. Factors affecting the prevalence of osteoarthritis in healthy middle-aged women: data from the longitudinal Melbourne Women's Midlife Health Project. *Bone* 2006; 39:1149-55.
97. Nadkar MY, Samant RS, Vaidya SS, Borges NE. Relationship between osteoarthritis of knee and menopause. *J Assoc Phys India* 1999; 47:1161-3.
98. Bergink AP, van Meurs JB, Loughlin J, Arp PP, Fang Y, Hofman A, et al. Estrogen receptor alpha gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women. *Arthritis Rheum* 2003; 48:1913-22.
99. Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Castañeda S, Jimenez SA. Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical, and therapeutic characteristics. *Semin Arthritis Rheum.* 2009;39(2):71-80.
100. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(1):16-21.
101. Jang S, Lee K, Ju JH. Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2619.
102. Bay-Jensen AC, Hoegh-Madsen S, Dam E, Henriksen K, Sondergaard BC, Pastoureau P, Qvist P, Karsdal MA. Which elements are involved in reversible and irreversible cartilage degradation in osteoarthritis? *Rheumatol Int.* 2010;30(4):435-42.
103. Georgiev T. Multimodal approach to intraarticular drug delivery in knee osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2020;40(11):1763-1769.
104. Velasquez MT, Katz JD. Osteoarthritis: another component of metabolic syndrome? *Metab Syndr Relat Disord.* 2010;8(4):295–305.
105. Ramly B, Afiqah-Aleng N, Mohamed-Hussein ZA. Protein-Protein Interaction Network Analysis Reveals Several Diseases Highly Associated with Polycystic Ovarian Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):2959.
106. Hanna F, Ebeling PR, Wang Y, O'Sullivan R, Davis S, Wluka AE, Cicuttini FM. Factors influencing longitudinal change in knee cartilage volume measured from magnetic resonance imaging in healthy men. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(7):1038-42.
107. Sanchez-Santos MT, Rubin KH, Glinborg D, Andersen MS, Kluzek S, Abrahamsen B. Prevalence and incidence of clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis in women with polycystic ovary syndrome: a National Register-Based Study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018;26, S200.

108. Eryılmaz ÖG, Kara M, Tiftik T, Aksakal FN, Uzunlar Ö, Su FA, Mollamahmutoğlu L, Özçakar L. Ultrasonographic measurement of the femoral cartilage thickness in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2012;97(1):235-7.
109. Smith RK, Heinegård D. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in digital sheath synovial fluid and serum with tendon injury. *Equine Vet J*. 2000;32(1):52-8.
110. Bruyere O, Collette J, Kothari M, Zaim S, White D, Genant H, et al. Osteoarthritis, magnetic resonance imaging, and biochemical markers: a one year prospective study. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(8):1050-4.
111. Vilím V, Olejárová M, Macháček S, Gatterová J, Kraus VB, Pavelka K. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(9):707-13.
112. Singh S, Shahi U, Kumar D, Shahi NT. Serum Cartilage Oligomeric Matrix Protein: Tool for early diagnosis and grading of severity of primary knee osteoarthritis. *Int J Osteol Orthop*. 2014;1: 1-7.
113. Awadallah AM, Gehan HS, Tarek MK. Serum level of cartilage oligomeric matrix protein as a screening modality for osteoarthritis among knee joint pain patients. *J Am Sci*. 2010;6(12).
114. Clark AG, Jordan JM, Vilim V, Renner JB, Dragomir AD, Luta G, et al. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum*. 1999;42(11):2356-64.
115. Nestler JE, Jakubowicz DJ, de Vargas AF, Brik C, Quintero N, Medina F. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(6):2001-5.
116. Munir I, Yen HW, Geller DH, Torbati D, Bierden RM, Weitsman SR, et al. Insulin augmentation of 17alpha-hydroxylase activity is mediated by phosphatidyl inositol 3-kinase but not extracellular signal-regulated kinase-1/2 in human ovarian theca cells. *Endocrinology*. 2004;145(1):175-83.
117. Adashi EY, Hsueh AJ, Yen SS. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology*. 1981;108(4):1441-9.
118. Moghetti P. Insulin Resistance and Polycystic Ovary Syndrome. *Curr Pharm Des*. 2016;22(36):5526-5534.
119. Carmina E, Gonzalez F, Vidali A, Stanczyk FZ, Ferin M, Lobo RA. The contributions of oestrogen and growth factors to increased adrenal androgen secretion in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 1999;14(2):307-11.
120. Tosi F, Negri C, Brun E, Castello R, Faccini G, Bonora E, et al. Insulin enhances ACTH-stimulated androgen and glucocorticoid metabolism in hyperandrogenic women. *Eur J Endocrinol*. 2011;164(2):197-203.
121. Spritzer PM. Polycystic ovary syndrome: reviewing diagnosis and management of metabolic disturbances. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(2):182-7.
122. Orbetsova M, Kamenov Z, Kolarov G, Zakhariyeva S, Khristov V, Atanasova I, et al. Effect of 6-month treatment with oral antiandrogen alone and in combination with insulin sensitizers on body composition, hormonal and metabolic parameters in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) in order to determine therapeutic strategy. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2006;45(7):16-28.
123. Orbetsova MM, Pehlivanov BK, Mitkov MM, Atanasova IB, Kamenov ZA, Kolarov GB, et al. Effect of short-term standard therapeutic regimens on neuropeptide Y and

- adipose tissue hormones in overweight insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome. *Folia Med (Plovdiv)*. 2011;53(3):15-24.
124. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979;237(3):E214-23.
 125. 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):412-9.
 126. Azziz R. Evaluation for insulin resistance and comorbidities related to insulin resistance in polycystic ovary syndrome. In *Insulin Resistance and Polycystic Ovarian Syndrome 2007*. Humana Press. pp. 1-13.
 127. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2402-10.
 128. Rabasa-Lhoret R, Bastard JP, Jan V, Ducluzeau PH, Andreelli F, Guebre F, et al. Modified quantitative insulin sensitivity check index is better correlated to hyperinsulinemic glucose clamp than other fasting-based index of insulin sensitivity in different insulin-resistant states. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(10):4917-23.
 129. Diamanti-Kandarakis E, Kouli C, Alexandraki K, Spina G. Failure of mathematical indices to accurately assess insulin resistance in lean, overweight, or obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(3):1273-6.
 130. Livadas S, Bothou C, Kuliczowska-Płaksej J, Robeva R, Vryonidou A, Macut JB, et al. Can dysglycemia in OGTT be predicted by baseline parameters in patients with PCOS? *Endocr Connect*. 2022;11(4):e210358.
 131. Orbetsova M, Orbetsova V, Kamenov Z, Kolarov G, Andreeva M, Genchev G, et al. Comparative diagnostic characteristics of carbohydrate metabolism disorders in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Akush Ginekol (Sofia)*. 2003;42(4):10-5.
 132. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548-56.
 133. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2006;113(6):898-918.
 134. Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(5):996-1003.
 135. Kelly CC, Lyall H, Petrie JR, Gould GW, Connell JM, Sattar N. Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(6):2453-5.
 136. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, González F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril*. 2011;95(3):1048-58.e1-2.
 137. Alissa EM, Algarni SA, Khaffji AJ, Al Mansouri NM. Impact of interleukin-6 on central obesity measures in women with polycystic ovarian syndrome. *J Obstet Gynaecol*. 2020;40(8):1133-1137.
 138. Escobar-Morreale HF, Botella-Carretero JJ, Villuendas G, Sancho J, San Millán JL. Serum interleukin-18 concentrations are increased in the polycystic ovary syndrome: relationship to insulin resistance and to obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(2):806-11.

139. Zhang YF, Yang YS, Hong J, Gu WQ, Shen CF, Xu M, et al. Elevated serum levels of interleukin-18 are associated with insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Endocrine*. 2006;29(3):419-23.
140. Dawood A, Alkafrawy N, Saleh S, Noreldin R, Zewain S. The relationship between IL-18 and atherosclerotic cardiovascular risk in Egyptian lean women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2018;34(4):294-297.
141. González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Evidence of proatherogenic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 2009;58(7):954-62.
142. Glintborg D, Andersen M, Richelsen B, Bruun JM. Plasma monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1 α are increased in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and associated with adiposity, but unaffected by pioglitazone treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71(5):652-8.
143. Hu W, Qiao J, Yang Y, Wang L, Li R. Elevated C-reactive protein and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;157(1):53-6.
144. Paradisi G, Steinberg HO, Hempfling A, Cronin J, Hook G, Shepard MK, et al. Polycystic ovary syndrome is associated with endothelial dysfunction. *Circulation*. 2001;103(10):1410-5.
145. Carmina E, Orio F, Palomba S, Longo RA, Cascella T, Colao A, et al. Endothelial dysfunction in PCOS: role of obesity and adipose hormones. *Am J Med*. 2006;119(4):356.e1-6.
146. Sabuncu T, Vural H, Harma M, Harma M. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem*. 2001;34(5):407-13.
147. Duleba AJ, Dokras A. Is PCOS an inflammatory process? *Fertil Steril*. 2012;97(1):7-12.
148. Nyagolova PV, Mitkov MD, Orbetsova MM. Role Of Vitamin D And Adipose Tissue Hormones In Women With Reproductive Disorders. *Folia Med (Plovdiv)*. 2015;57(1):5-10.
149. Mitkov M, Pehlivanov B, Orbetsova M. Serum ghrelin level in women with polycystic ovary syndrome and its relationship with endocrine and metabolic parameters. *Gynecol Endocrinol*. 2008;24(11):625-30.
150. Daan NM, Koster MP, de Wilde MA, Dalmeijer GW, Evelein AM, Fauser BC, et al. Biomarker Profiles in Women with PCOS and PCOS Offspring; A Pilot Study. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165033.
151. Rayanova G, Ganeva S, Todorova K, Lukanov T, Gecheva S. Levels Of Resistin And Visfatin In Patients With Metabolic Syndrome. *J Biomed Clin Res*. 2015;8(1): 40-45.
152. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet*. 2000;355(9214):1518-9.
153. Moreno-Navarrete JM, Sabater M, Ortega F, Ricart W, Fernández-Real JM. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. *PLoS One*. 2012;7(5):e37160.
154. Zhang D, Zhang L, Yue F, Zheng Y, Russell R. Serum zonulin is elevated in women with polycystic ovary syndrome and correlates with insulin resistance and severity of anovulation. *Eur J Endocrinol*. 2015;172(1):29-36.
155. Cetin Z, Kosem A, Can B, Baser O, Catak M, Turhan T, et al. Serum zonulin level is not elevated in patients with polycystic ovary syndrome without metabolic syndrome. *Arch Gynecol Obstet*. 2019;300(6):1785-1790.

156. Ushach I, Burkhardt AM, Martinez C, Hevezi PA, Gerber PA, Buhren BA, et al. METEORIN-LIKE is a cytokine associated with barrier tissues and alternatively activated macrophages. *Clin Immunol.* 2015;156(2):119-27.
157. Rao RR, Long JZ, White JP, Svensson KJ, Lou J, Lokurkar I, et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell.* 2014;157(6):1279-1291.
158. Lee JH, Kang YE, Kim JM, Choung S, Joung KH, Kim HJ, et al. Serum Meteorin-like protein levels decreased in patients newly diagnosed with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;135:7-10.
159. Zheng SL, Li ZY, Zhang Z, Wang DS, Xu J, Miao CY. Evaluation of Two Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for the Detection of Human Circulating Metrnl. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2018;66(4):391-398.
160. Chung HS, Hwang SY, Choi JH, Lee HJ, Kim NH, Yoo HJ, et al. Implications of circulating Meteorin-like (Metrnl) level in human subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;136:100-107.
161. Li ZY, Song J, Zheng SL, Fan MB, Guan YF, Qu Y, et al. Adipocyte Metrnl Antagonizes Insulin Resistance Through PPAR γ Signaling. *Diabetes.* 2015;64(12):4011-22.
162. Löffler D, Landgraf K, Rockstroh D, Schwartze JT, Duzendorfer H, Kiess W, et al. METRNL decreases during adipogenesis and inhibits adipocyte differentiation leading to adipocyte hypertrophy in humans. *Int J Obes (Lond).* 2017;41(1):112-119.
163. Fouani FZ, Fadaei R, Moradi N, Zandieh Z, Ansaripour S, Yekaninejad MS, et al. Circulating levels of Meteorin-like protein in polycystic ovary syndrome: A case-control study. *PLoS One.* 2020;15(4):e0231943.
164. Eckardt K, Görgens SW, Raschke S, Eckel J. Myokines in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2014;57(6):1087-99.
165. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(8):457-65.
166. Assyov Y, Gateva A, Tsakova A, Kamenov Z. Irisin in the Glucose Continuum. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2016;124(1):22-7.
167. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature.* 2002;415(6869):339-43.
168. Seldin MM, Wong GW. Regulation of tissue crosstalk by skeletal muscle-derived myonectin and other myokines. *Adipocyte.* 2012;1(4):200-202.
169. Seldin MM, Peterson JM, Byerly MS, Wei Z, Wong GW. Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *J Biol Chem.* 2012;287(15):11968-80.
170. Park SY, Choi JH, Ryu HS, Pak YK, Park KS, Lee HK, et al. C1q tumor necrosis factor alpha-related protein isoform 5 is increased in mitochondrial DNA-depleted myocytes and activates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2009;284(41):27780-9.
171. Demir İ, Guler A. Association of decreased myonectin levels with metabolic and hormonal disturbance in polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2020:1-4.
172. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science.* 1994;264(5161):965-8.
173. Sun H, Liu D. Hydrodynamic delivery of interleukin 15 gene promotes resistance to high fat diet-induced obesity, fatty liver and improves glucose homeostasis. *Gene Ther.* 2015;22(4):341-7.

174. Almendro V, Fuster G, Busquets S, Ametller E, Figueras M, Argilés JM, et al. Effects of IL-15 on rat brown adipose tissue: uncoupling proteins and PPARs. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(2):285-9.
175. Barra NG, Chew MV, Holloway AC, Ashkar AA. Interleukin-15 treatment improves glucose homeostasis and insulin sensitivity in obese mice. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14(2):190-3.
176. Duan Y, Li F, Wang W, Guo Q, Wen C, Li Y, et al. Interleukin-15 in obesity and metabolic dysfunction: current understanding and future perspectives. *Obes Rev*. 2017;18(10):1147-1158.
177. Barra NG, Reid S, MacKenzie R, Werstuck G, Trigatti BL, Richards C, et al. Interleukin-15 contributes to the regulation of murine adipose tissue and human adipocytes. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(8):1601-7.
178. Nielsen AR, Hojman P, Erikstrup C, Fischer CP, Plomgaard P, Mounier R, et al. Association between interleukin-15 and obesity: interleukin-15 as a potential regulator of fat mass. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4486-93.
179. Matthews VB, Aström MB, Chan MH, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, et al. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*. 2009;52(7):1409-18.
180. Karczewska-Kupczewska M, Kowalska I, Nikolajuk A, Adamska A, Zielińska M, Kamińska N, et al. Circulating brain-derived neurotrophic factor concentration is downregulated by intralipid/heparin infusion or high-fat meal in young healthy male subjects. *Diabetes Care*. 2012;35(2):358-62.
181. Pedersen BK. The diseasome of physical inactivity--and the role of myokines in muscle-fat cross talk. *J Physiol*. 2009;587(Pt 23):5559-68.
182. Tsuchida A, Nakagawa T, Itakura Y, Ichihara J, Ogawa W, Kasuga M, et al. The effects of brain-derived neurotrophic factor on insulin signal transduction in the liver of diabetic mice. *Diabetologia*. 2001;44(5):555-66.
183. Ono M, Itakura Y, Nonomura T, Nakagawa T, Nakayama C, Taiji M, et al. Intermittent administration of brain-derived neurotrophic factor ameliorates glucose metabolism in obese diabetic mice. *Metabolism*. 2000;49:129-33.
184. Krabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Rasmussen P, Erikstrup C, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007;50(2):431-8.
185. Li B, Lang N, Cheng ZF. Serum Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor Are Associated with Diabetes Risk, Complications, and Obesity: a Cohort Study from Chinese Patients with Type 2 Diabetes. *Mol Neurobiol*. 2016;53(8):5492-9.
186. Seifer DB, Feng B, Shelden RM. Immunocytochemical evidence for the presence and location of the neurotrophin-Trk receptor family in adult human preovulatory ovarian follicles. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(4):1129-34; discussion 1134-6.
187. Seifer DB, Feng B, Shelden RM, Chen S, Dreyfus CF. Neurotrophin-4/5 and neurotrophin-3 are present within the human ovarian follicle but appear to have different paracrine/autocrine functions. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(10):4569-71.
188. Seifer DB, Feng B, Shelden RM, Chen S, Dreyfus CF. Brain-derived neurotrophic factor: a novel human ovarian follicular protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(2):655-9.
189. Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology*. 1998;37(12):1553-61.

190. Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Schneyer AL. Ovarian brain-derived neurotrophic factor is present in follicular fluid from normally cycling women. *Fertil Steril.* 2003;79(2):451-2.
191. Begliuomini S, Casarosa E, Pluchino N, Lenzi E, Centofanti M, Freschi L, et al. Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor. *Hum Reprod.* 2007;22(4):995-1002.
192. Poduslo JF, Curran GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996;36(2):280-6.
193. Cubeddu A, Giannini A, Bucci F, Merlini S, Casarosa E, Pluchino N, et al. Paroxetine increases brain-derived neurotrophic factor in postmenopausal women. *Menopause.* 2010;17(2):338-43.
194. Cubeddu A, Bucci F, Giannini A, Russo M, Daino D, Russo N, et al. Brain-derived neurotrophic factor plasma variation during the different phases of the menstrual cycle in women with premenstrual syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 2011;36(4):523-30.
195. Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging.* 2005;26(1):115-23.
196. Russo N, Russo M, Daino D, Bucci F, Pluchino N, Casarosa E, et al. Polycystic ovary syndrome: brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plasma and follicular fluid levels. *Gynecol Endocrinol.* 2012;28(4):241-4.
197. Moghetti P, Tosi F, Bonin C, Di Sarra D, Fiers T, Kaufman JM, et al. Divergences in insulin resistance between the different phenotypes of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(4):E628-37.
198. DeUgarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil Steril.* 2005;83(5):1454-60.
199. Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, McAllister JM. Human ovarian theca cells in culture. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(2):65-71.
200. Escobar-Morreale HF, San Millán JL. Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(7):266-72.
201. Franks S, McCarthy MI, Hardy K. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl.* 2006;29(1):278-85; discussion 286-90.
202. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J Endocrinol.* 2002;174(1):1-5.
203. De Leo V, Musacchio MC, Cappelli V, Massaro MG, Morgante G, Petraglia F. Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: an update. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016;14(1):38.
204. Maliqueo M, Lara HE, Sánchez F, Echiburú B, Crisosto N, Sir-Petermann T. Placental steroidogenesis in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;166(2):151-5.
205. Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Pérez-Bravo F, Recabarren SE. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum Reprod.* 2002;17(10):2573-9.
206. Hart R, Doherty DA, Norman RJ, Franks S, Dickinson JE, Hickey M, et al. Serum antimullerian hormone (AMH) levels are elevated in adolescent girls with polycystic ovaries and the polycystic ovarian syndrome (PCOS). *Fertil Steril.* 2010;94(3):1118-21.

207. Lewy VD, Danadian K, Witchel SF, Arslanian S. Early metabolic abnormalities in adolescent girls with polycystic ovarian syndrome. *J Pediatr.* 2001;138(1):38-44.
208. Condorelli RA, Calogero AE, Di Mauro M, Mongioi' LM, Cannarella R, Rosta G, et al. Androgen excess and metabolic disorders in women with PCOS: beyond the body mass index. *J Endocrinol Invest.* 2018;41(4):383-388.
209. Dumesic DA, Akopians AL, Madrigal VK, Ramirez E, Margolis DJ, Sarma MK, et al. Hyperandrogenism Accompanies Increased Intra-Abdominal Fat Storage in Normal Weight Polycystic Ovary Syndrome Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(11):4178-4188.
210. Banaszewska B, Spaczyński RZ, Pelesz M, Pawelczyk L. Incidence of elevated LH/FSH ratio in polycystic ovary syndrome women with normo- and hyperinsulinemia. *Rocz Akad Med Białymst.* 2003;48:131-4.
211. Kalro BN, Loucks TL, Berga SL. Neuromodulation in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2001;28(1):35-62.
212. Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 2008;14(4):367-78.
213. Burt Solorzano CM, McCartney CR, Blank SK, Knudsen KL, Marshall JC. Hyperandrogenaemia in adolescent girls: origins of abnormal gonadotropin-releasing hormone secretion. *BJOG.* 2010;117(2):143-9.
214. Robeva R, Andonova S, Tomova A, Kumanov P, Savov A. LHCG receptor polymorphisms in PCOS patients. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2018; 32(2):427-432.
215. Qiao J, Feng HL. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update.* 2011;17(1):17-33.
216. Diamanti-Kandarakis E. Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Med.* 2008;10:e3.
217. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1235-316.
218. Gaytán F, Gaytán M, Castellano JM, Romero M, Roa J, Aparicio B, et al. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(3):E520-31.
219. Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS. Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev.* 2015;36(5):487-525.
220. Visser JA, Schipper I, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(6):331-41.
221. Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays.* 1991;13(11):569-74.
222. Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science.* 2002;296(5576):2178-80.
223. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;258:1946–1949.
224. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995;50:83–90.

225. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215(1):89-97.
226. Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, et al. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol* 1998;353(1):23-31.
227. McKinney M, Cravatt B. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem* 2005;74:411-432.
228. Dinh T, Freund T, Piomelli D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 2002;121(1-2):149-158.
229. Fezza F, Bari M, Florio R, Talamonti E, Feole M, Maccarrone M. Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules* 2014;19(11):17078-17106.
230. Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, et al. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem* 1993;214:173-180.
231. Pertwee R. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Therapeut* 1997;74:129-180.
232. Pertwee R, Ross R. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66:101-121.
233. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;365:61-65.
234. Viscomi MT, Oddi S, Latini L, Pasquariello N, Florenzano F, Bernardi G, et al. Selective CB2 receptor agonism protects central neurons from remote axotomy-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway. *J Neurosci* 2009;29:4564-4570.
235. Sharov AA, Piao Y, Matoba R, Dudekula DB, Qian Y, VanBuren V, et al. Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. *PLoS Biol* 2003;1:E74.
236. Helliwell R, Chamley L, Blake-Palmer K, Mitchell M, Wu J, Kearns C, et al. Characterization of the endocannabinoid system in early human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5168-5174.
237. Denny M, Friel A, Houlihan D, Broderick V, Smith T, Morrison J. Cannabinoids and the human uterus during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:2-9.
238. El-Talatini MR, Taylor AH, Elson JC, Brown L, Davidson AC, Konje JC. Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS One*. 2009;4(2):e4579.
239. Fioramonti J, Bueno L. Role of cannabinoid receptors in the control of gastrointestinal motility and perception. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008;2:385-397.
240. Mallat A, Lotersztajn S. Endocannabinoids and liver disease. I. Endocannabinoids and their receptors in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294(1):G9-G12.
241. Pacher P, Steffens S. The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol* 2009;31:63-77.
242. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3(9):771-784.
243. Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M. The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci* 2012;6:9.
244. González S, Manzanares J, Berrendero F, Wenger T, Corchero J, Bisogno T, et al. Identification of endocannabinoids and cannabinoid CB1 receptor mRNA in the pituitary gland. *Neuroendocrinology* 1999;70(2):137-145.
245. Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99(12):8384-8388.

246. Partosoedarso E, Abrahams T, Scullion R, Moerschbaecher J, Hornby P. Cannabinoid1 receptor in the dorsal vagal complex modulates lower oesophageal sphincter relaxation in ferrets. *J Physiol* 2003;550(1):149-158.
247. Marzo V, Petrocellis L. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu Rev Med* 2006;57:553-574.
248. Hill M, Ho W, Sinopoli K, Viau V, Hillard C, Gorzalka B. Involvement of the endocannabinoid system in the ability of long-term tricyclic antidepressant treatment to suppress stress-induced activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Neuropsychopharmacology* 2006;31(12):2591-2599.
249. Di Marzo V, Goparaju S, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járαι Z, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001;410:822-825.
250. Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18(1):27-37.
251. Verty AN, McGregor IS, Mallet PE, Oldfield BJ. The impact of cannabinoid receptor (CB1) antagonists on the central neural circuitry mediating energy balance. 36th Neuroscience Annual Meeting, Washington, USA, 2006; Poster number 456.3/BB3.
252. Gamber K, Macarthur H, Westfall T. Cannabinoids augment the release of neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Neuropharmacology* 2005;49(5):646-652.
253. Coutts A, Izzo A. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4(6):572-579.
254. Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB 1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005;115(5):1298-1305.
255. Matias I, Gonthier M, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and β -pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(8):3171-3180.
256. Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelnik K, Janke J, Bátkai S, et al. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005;54(10):2838-2843.
257. Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003;112(3):423-431.
258. Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand J, Le Fur G, Oury-Donat F, et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 2003;63(4):908-914.
259. Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier M, Laborde C, Baron J, et al. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol* 2006;126(2):177-187.
260. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 2006;27(1):73-100.
261. Juan-Picó P, Fuentes E, Bermudez-Silva F, Diaz-Molina F, Ripoll C, de Fonseca F, et al. Cannabinoid receptors regulate Ca²⁺ signals and insulin secretion in pancreatic β -cell. *Cell calcium* 2006; 39(2):155-162.
262. Cota D, Marsicano G, Lutz B, Vicennati V, Stalla G, Pasquali R, et al. Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int J Obes* 2003;27(3):289-301.

263. Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Péleraux A, et al. The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J* 2005;19(11):1567-1569.
264. Cote M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Almeras N, Despres JP, et al. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes* 2007;31(4):692-699.
265. Di Marzo V, Cote M, Matias I, Lemieux I, Arsenault B, Cartier A, et al. Changes in plasma endocannabinoid levels in viscerally obese men following a 1 year lifestyle modification programme and waist circumference reduction: associations with changes in metabolic risk factors. *Diabetologia* 2009;52(2):213.
266. Matias I, Petrosino S, Racioppi A, Capasso R, Izzo A, Di Marzo V. Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: effect of high fat diets. *Mol Cell Endocrinol* 2008;286(1-2):S66-S78.
267. Di Marzo V. The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2008;51(8):1356-1367.
268. Starowicz K, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo A, et al. Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity* 2008;16(3):553-565.
269. Kunos G, Osei-Hyiaman D, Liu J, Godlewski G, Bátkai S. Endocannabinoids and the control of energy homeostasis. *J Biol Chem* 2008;283(48):33021-33025.
270. Kunos G, Osei-Hyiaman D, Bátkai S, Sharkey K, Makriyannis A. Should peripheral CB1 cannabinoid receptors be selectively targeted for therapeutic gain? *Trends Pharmacol Sci* 2009;30(1):1-7.
271. Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 2007;18(2):129-140.
272. Richey JM, Woolcott O. Re-visiting the Endocannabinoid System and Its Therapeutic Potential in Obesity and Associated Diseases. *Curr Diab Rep* 2017;17(10):99.
273. Van Gaal L, Pi-Sunyer X, Després J, McCarthy C, Scheen A. Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care* 2008;31:S229-240.
274. Pi-Sunyer F, Aronne L, Heshmati H, Devin J, Rosenstock J, Group R-NAS. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006;295(7):761-75.
275. Van Gaal L, Rissanen A, Scheen A, Ziegler O, Rössner S, Group R-ES. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 2005;365:1389-1397.
276. Scheen A. CB1 receptor blockade and its impact on cardiometabolic risk factors: overview of the RIO programme with rimonabant. *J Neuroendocrinol* 2008;20(S1):139-146.
277. Ducobu J, Sternon J. Rimonabant (Acomplia), specific inhibitor of the endocannabinoid system. *J Pharm Belg* 2005;60(3):89-91.
278. Di Marzo V, Szallasi A. Rimonabant in rats with a metabolic syndrome: good news after the depression. *Br J Pharmacol* 2008;154(5):915-917.
279. Lazzarin N, Valensise H, Bari M, Ubaldi F, Battista N, Finazzi-Agro A, et al. Fluctuations of fatty acid amide hydrolase and anandamide levels during the human ovulatory cycle. *Gynecol Endocrinol* 2004;18:212-218.

280. Taylor A, Ang C, Bell S, Konje J. The role of the endocannabinoid system in gametogenesis, implantation and early pregnancy. *Hum Reprod Update* 2007;13:501–513.
281. El-Talatini M, Taylor A, Konje J. The relationship between plasma levels of the endocannabinoid, anandamide, sex steroids, and gonadotrophins during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2010;93:1989–1996.
282. El-Talatini MR, Taylor AH, Konje JC. Fluctuation in anandamide levels from ovulation to early pregnancy in in-vitro fertilization-embryo transfer women, and its hormonal regulation. *Hum Reprod.* 2009;24(8):1989–1998.
283. Peralta L, Agirregoitia E, Mendoza R, Exposito A, Casis L, Matorras R, et al. Expression and localization of cannabinoid receptors in human immature oocytes and unfertilized metaphase-II oocytes. *Reprod BioMed Online* 2011;23:372–379.
284. Di Blasio A, Vignali M, Gentilini D. The endocannabinoid pathway and the female reproductive organs. *J Mol Endocrinol* 2013;50(1):R1-R9.
285. Maccarrone M, Bari M, Battista N, Finazzi-Agro A. Estrogen stimulates arachidonylethanolamide release from human endothelial cells and platelet activation. *Blood* 2002;100:4040–4048.
286. Habayeb O, Taylor A, Evans M, Cooke M, Taylor D, Bell S, et al. Plasma levels of the endocannabinoid anandamide in women - a potential role in pregnancy maintenance and labor? *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5482–5487.
287. Maccarrone M, Valensise H, Bari M, Lazzarin N, Romanini C, Finazzi-Agro A. Relation between decreased anandamide hydrolase concentrations in human lymphocytes and miscarriage. *Lancet* 2000;355:1326–1329.
288. Schuel H, Burkman L, Lippes J, Crickard K, Forester E, Piomelli D, et al. Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem Phys Lipids* 2002;121:211–227.
289. Dawson A, Kilpatrick E, Coady A, Elshewehy A, Dakroury Y, Ahmed L, et al. Endocannabinoid receptor blockade reduces alanine aminotransferase in polycystic ovary syndrome independent of weight loss. *BMC Endocr Disord* 2017;17(1):41.
290. Pagotto U, Gambineri A, Vicennati V, Pasquali R. Involvement of the Endocannabinoid System in Metabolism and Fertility. In *Insulin Resistance and Polycystic Ovarian Syndrome*. Humana Press 2007:385-396.
291. Bermudez-Siva F, Serrano A, Diaz-Molina F, Vera I, Juan-Pico P, Nadal A, et al. Activation of cannabinoid CB1 receptors induces glucose intolerance in rats. *Eur J Pharmacol* 2006;531:282–284.
292. Ahrens K, Mumford S, Schliep K, Kissell K, Neil M, Perkins J, et al. Serum leptin levels and reproductive function during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 2014;210:248.e1-9.
293. Battista N, Pasquariello N, Di Tommaso M, Maccarrone M. Interplay between endocannabinoids, steroids and cytokines in the control of human reproduction. *J Neuroendocrinol* 2008;20:82–89.
294. Juan C, Chen K, Wang P, Hwang J, Seow K. Endocannabinoid system activation may be associated with insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2015;104(1):200-206.
295. Cui N, Yang Y, Xu Y, Zhang J, Jiang L, Hao G. Decreased expression of fatty acid amide hydrolase in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2017;33(5):368-372.
296. Cui N, Feng X, Zhao Z, Zhang J, Xu Y, Wang L, et al. Restored Plasma Anandamide and Endometrial Expression of Fatty Acid Amide Hydrolase in Women With Polycystic

- Ovary Syndrome by the Combination Use of Diane-35 and Metformin. *Clin Ther* 2017;39(4):751-758.
297. Rapino C, Battista N, Bari M, Maccarrone M. Endocannabinoids as biomarkers of human reproduction. *Hum Reprod Update* 2014;20(4):501-516.
298. Nestler JE, Stovall D, Akhter N, Iuorno MJ, Jakubowicz DJ. Strategies for the use of insulin-sensitizing drugs to treat infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2002;77(2):209-15.
299. Velázquez E, Acosta A, Mendoza SG. Menstrual cyclicality after metformin therapy in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol*. 1997;90(3):392-5.
300. Moghetti P, Castello R, Negri C, Tosi F, Perrone F, Caputo M, et al. Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(1):139-46.
301. Ibáñez L, Valls C, Ferrer A, Marcos MV, Rodríguez-Hierro F, de Zegher F. Sensitization to insulin induces ovulation in nonobese adolescents with anovulatory hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(8):3595-8.
302. Fleming R, Hopkinson ZE, Wallace AM, Greer IA, Sattar N. Ovarian function and metabolic factors in women with oligomenorrhea treated with metformin in a randomized double blind placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(2):569-74.
303. Kamenov Z, Gateva A. Inositols in PCOS. *Molecules*. 2020;25(23):5566.
304. Facchinetti F, Unfer V, Dewailly D, Kamenov ZA, Diamanti-Kandarakis E, et al. Inositols in Polycystic Ovary Syndrome: An Overview on the Advances. *Trends Endocrinol Metab*. 2020;31(6):435-447.
305. Kamenov Z, Kolarov G, Gateva A, Carlomagno G, Genazzani AD. Ovulation induction with myo-inositol alone and in combination with clomiphene citrate in polycystic ovarian syndrome patients with insulin resistance. *Gynecol Endocrinol*. 2015;31(2):131-5.
306. Gateva A, Unfer V, Kamenov Z. The use of inositol(s) isomers in the management of polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Gynecol Endocrinol*. 2018;34(7):545-550.
307. Colazingari S, Treglia M, Najjar R, Bevilacqua A. The combined therapy myo-inositol plus D-chiro-inositol, rather than D-chiro-inositol, is able to improve IVF outcomes: results from a randomized controlled trial. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;288(6):1405-11.
308. Iuorno MJ, Nestler JE. Insulin-lowering drugs in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2001;28(1):153-64.
309. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Iuorno MJ. Role of inositolphosphoglycan mediators of insulin action in the polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2000;13 Suppl 5:1295-8. PMID: 11117673.
310. Nestler JE, Unfer V. Reflections on inositol(s) for PCOS therapy: steps toward success. *Gynecol Endocrinol*. 2015;31(7):501-5.
311. Unfer V, Nestler JE, Kamenov ZA, Prapas N, Facchinetti F. Effects of Inositol(s) in Women with PCOS: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Int J Endocrinol*. 2016;2016:1849162.
312. Papaleo E, Unfer V, Baillargeon JP, De Santis L, Fusi F, Brigante C, et al. Myo-inositol in patients with polycystic ovary syndrome: a novel method for ovulation induction. *Gynecol Endocrinol*. 2007;23(12):700-3.
313. Raffone E, Rizzo P, Benedetto V. Insulin sensitiser agents alone and in co-treatment with r-FSH for ovulation induction in PCOS women. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26(4):275-80.

314. Ciotta L, Stracquadiano M, Pagano I, Carbonaro A, Palumbo M, Gulino F. Effects of myo-inositol supplementation on oocyte's quality in PCOS patients: a double blind trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(5):509-14.
315. Minozzi M, Nordio M, Pajalich R. The Combined therapy myo-inositol plus D-Chiro-inositol, in a physiological ratio, reduces the cardiovascular risk by improving the lipid profile in PCOS patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(4):537-40.
316. Zacchè MM, Caputo L, Filippis S, Zacchè G, Dindelli M, Ferrari A. Efficacy of myo-inositol in the treatment of cutaneous disorders in young women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2009;25(8):508-13.
317. Artini PG, Di Berardino OM, Papini F, Genazzani AD, Simi G, Ruggiero M, et al. Endocrine and clinical effects of myo-inositol administration in polycystic ovary syndrome. A randomized study. *Gynecol Endocrinol.* 2013;29(4):375-9.
318. Morgante G, Orvieto R, Di Sabatino A, Musacchio MC, De Leo V. The role of inositol supplementation in patients with polycystic ovary syndrome, with insulin resistance, undergoing the low-dose gonadotropin ovulation induction regimen. *Fertil Steril.* 2011;95(8):2642-4.
319. Yildiz BO. Recent advances in the treatment of polycystic ovary syndrome. *Expert Opin Investig Drugs.* 2004;13(10):1295-305.
320. Diamond MP, Legro RS, Coutifaris C, Alvero R, Robinson RD, Casson P, et al. Letrozole, Gonadotropin, or Clomiphene for Unexplained Infertility. *N Engl J Med.* 2015;373(13):1230-40.
321. Cha KY, Chung HM, Lee DR, Kwon H, Chung MK, Park LS, et al. Obstetric outcome of patients with polycystic ovary syndrome treated by in vitro maturation and in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2005;83(5):1461-5.
322. Farquhar C, Brown J, Marjoribanks J. Laparoscopic drilling by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;(6):CD001122.
323. Abu Hashim H, Al-Inany H, De Vos M, Tournaye H. Three decades after Gjönnaess's laparoscopic ovarian drilling for treatment of PCOS; what do we know? An evidence-based approach. *Arch Gynecol Obstet.* 2013;288(2):409-22.
324. Rosen R, Brown C, Heiman J, Leiblum S, Meston C, Shabsigh R, et al. The Female Sexual Function Index (FSFI): a multidimensional self-report instrument for the assessment of female sexual function. *J Sex Marital Ther.* 2000;26(2):191-208.
325. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO expert consultation, Geneva, Switzerland; 2000.
326. Sun D, Li W, Zhang H, Li Y, Zhang Q. Inverted U-shaped relationship between body mass index and multivessel lesions in Chinese patients with myocardial infarction: a cross-sectional study. *J Int Med Res.* 2020;48(7):300060520932820.
327. Coutinho T, Goel K, Corrêa de Sá D, Carter RE, Hodge DO, Kragelund C, Kanaya AM, Zeller M, Park JS, Kober L, Torp-Pedersen C, Cottin Y, Lorgis L, Lee SH, Kim YJ, Thomas R, Roger VL, Somers VK, Lopez-Jimenez F. Combining body mass index with measures of central obesity in the assessment of mortality in subjects with coronary disease: role of "normal weight central obesity". *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(5):553-60.
328. Ashwell M, Hsieh SD. Six reasons why the waist-to-height ratio is a rapid and effective global indicator for health risks of obesity and how its use could simplify the international public health message on obesity. *Int J Food Sci Nutr.* 2005;56(5):303-7.
329. World Health Organization. Waist circumference and waist-hip ratio. Report of a WHO expert consultation, Geneva, Switzerland; 2011.

330. Browning LM, Hsieh SD, Ashwell M. A systematic review of waist-to-height ratio as a screening tool for the prediction of cardiovascular disease and diabetes: 0.5 could be a suitable global boundary value. *Nutr Res Rev.* 2010;23(2):247-69.
331. Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D. Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;140:815–830.
332. Pochi PE, Shalita AR, Strauss JS, Webster SB, Cunliffe WJ, Katz HI, et al. Report of the Consensus Conference on Acne Classification. Washington, D.C., March 24 and 25, 1990. *J Am Acad Dermatol.* 1991;24(3):495-500.
333. Ludwig E. Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occurring in the female sex. *Br J Dermatol.* 1977;97(3):247-54.
334. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2018;39(33):3021-3104.
335. Phillips JA. Dietary Guidelines for Americans, 2020-2025. *Workplace Health Saf.* 2021;69(8):395.
336. Brakta S, Lizneva D, Mykhalchenko K, Imam A, Walker W, Diamond MP, et al. Perspectives on Polycystic Ovary Syndrome: Is Polycystic Ovary Syndrome Research Underfunded? *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(12):4421-4427.
337. Radosh L. Drug treatments for polycystic ovary syndrome. *Am Fam Physician.* 2009;79(8):671-6.
338. Dokras A, Saini S, Gibson-Helm M, Schulkin J, Cooney L, Teede H. Gaps in knowledge among physicians regarding diagnostic criteria and management of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2017;107(6):1380-1386.e1.
339. Padmanabhan V. Polycystic ovary syndrome--"A riddle wrapped in a mystery inside an enigma". *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(6):1883-5.
340. Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(5):270-284.
341. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 2005 Mar 24;352(12):1223-36.
342. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15(5):288-298.
343. Wright SM, Aronne LJ. Causes of obesity. *Abdom Imaging.* 2012;37(5):730-2.
344. Hellenthal G, Busby GBJ, Band G, Wilson JF, Capelli C, Falush D, et al. A genetic atlas of human admixture history. *Science.* 2014;343(6172):747-751.
345. Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ES, Moran C, Lazenby J, Stephens KC, et al. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(2):453-62.
346. Carmina E, Rosato F, Janni A, Rizzo M, Longo RA. Extensive clinical experience: relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(1):2-6.
347. Uysal G, Sahin Y, Unluhizarci K, Ferahbas A, Uludag SZ, Aygen E, et al. Is acne a sign of androgen excess disorder or not? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017;211:21-25.
348. Lizneva D, Gavrilova-Jordan L, Walker W, Azziz R. Androgen excess: Investigations and management. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2016;37:98-118.
349. Ibáñez L, Valls C, Potau N, Marcos MV, de Zegher F. Polycystic ovary syndrome after precocious pubarche: ontogeny of the low-birthweight effect. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001;55(5):667-72.
350. Fruzzetti F, Baldari F, Palla G, Fidicicchi T, Carmina E. Comparison of PCOS phenotypes in adolescent and young adult Mediterranean women with possible PCOS. *J Endocrinol Invest.* 2021;44(5):995-1000.

351. Zore T, Lizneva D, Brakta S, Walker W, Suturina L, Azziz R. Minimal difference in phenotype between adolescents and young adults with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2019;111(2):389-396.
352. Ibáñez L, Valls C, Potau N, Marcos MV, de Zegher F. Sensitization to insulin in adolescent girls to normalize hirsutism, hyperandrogenism, oligomenorrhea, dyslipidemia, and hyperinsulinism after precocious pubarche. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(10):3526-30.
353. Elting MW, Korsen TJ, Rekers-Mombarg LT, Schoemaker J. Women with polycystic ovary syndrome gain regular menstrual cycles when ageing. *Hum Reprod*. 2000;15(1):24-8.
354. Winters SJ, Talbott E, Guzick DS, Zborowski J, McHugh KP. Serum testosterone levels decrease in middle age in women with the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2000;73(4):724-9.
355. Wild S, Pierpoint T, Jacobs H, McKeigue P. Long-term consequences of polycystic ovary syndrome: results of a 31 year follow-up study. *Hum Fertil (Camb)*. 2000;3(2):101-105.
356. Drosdzol A, Skrzypulec V, Mazur B, Pawlińska-Chmara R. Quality of life and marital sexual satisfaction in women with polycystic ovary syndrome. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45 Suppl 1:S93-7.
357. Ercan CM, Coksuer H, Aydogan U, Alanbay I, Keskin U, Karasahin KE, et al. Sexual dysfunction assessment and hormonal correlations in patients with polycystic ovary syndrome. *Int J Impot Res*. 2013;25(4):127-32.
358. Georgiev T, Ivanova M, Kopchev A, Velikova T, Miloshov A, Kurteva E, et al. Cartilage oligomeric protein, matrix metalloproteinase-3, and Coll2-1 as serum biomarkers in knee osteoarthritis: a cross-sectional study. *Rheumatol Int*. 2018;38(5):821-830.
359. Laudon J, Whittaker JL, Ren G, Jaremko JL, Emery CA, Krawetz RJ. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) expression in individuals who sustained a youth sport-related intra-articular knee injury 3-10 years previously and uninjured matched controls. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019;27(2):286-293.
360. Denning WM, Winward JG, Pardo MB, Hopkins JT, Seeley MK. Body weight independently affects articular cartilage catabolism. *J Sports Sci Med*. 2015;14(2):290-6.
361. Golightly YM, Marshall SW, Kraus VB, Renner JB, Villaveces A, Casteel C, et al. Biomarkers of incident radiographic knee osteoarthritis: do they vary by chronic knee symptoms? *Arthritis Rheum*. 2011;63(8):2276-83.
362. Da Silva JA, Larbre JP, Spector TD, Perry LA, Scott DL, Willoughby DA. Protective effect of androgens against inflammation induced cartilage degradation in male rodents. *Ann Rheum Dis*. 1993;52(4):285-91.
363. DeVane GW, Czekala NM, Judd HL, Yen SS. Circulating gonadotropins, estrogens, and androgens in polycystic ovarian disease. *Am J Obstet Gynecol*. 1975;121(4):496-500.
364. Kluzek S, Rubin KH, Sanchez-Santos M, O'Hanlon MS, Andersen M, Glinborg D, et al. Accelerated osteoarthritis in women with polycystic ovary syndrome: a prospective nationwide registry-based cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2021;23(1):225.
365. Kara M, Okur A, Serin Hİ. Ultrasonographic evaluation of femoral cartilage thickness in patients with polycystic ovary syndrome. *Acta Clin Croat*. 2019;58(1):103-106.
366. Calvo E, Palacios I, Delgado E, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Egido J, et al. Histopathological correlation of cartilage swelling detected by magnetic resonance imaging in early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(11):878-86.

367. Sakthiswary R, Rajalingam S, Hussein H, Sridharan R, Asrul AW. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and its correlation with sonographic knee cartilage thickness and disease activity. *Clin Rheumatol.* 2017;36(12):2683-2688.
368. Kühne SA, Neidhart M, Everson MP, Häntzschel H, Fine PR, Gay S, et al. Persistent high serum levels of cartilage oligomeric matrix protein in a subgroup of patients with traumatic knee injury. *Rheumatol Int.* 1998;18(1):21-5.
369. Norman RJ, Davies MJ, Lord J, Moran LJ. The role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(6):251-7.
370. Harrold JA, Elliott JC, King PJ, Widdowson PS, Williams G. Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Brain Res.* 2002;952(2):232-8.
371. Seidell JC. Waist circumference and waist/hip ratio in relation to all-cause mortality, cancer and sleep apnea. *Eur J Clin Nutr.* 2010;64(1):35-41.
372. Cani PD, Montoya ML, Neyrinck AM, Delzenne NM, Lambert DM. Potential modulation of plasma ghrelin and glucagon-like peptide-1 by anorexigenic cannabinoid compounds, SR141716A (rimonabant) and oleoylethanolamide. *Br J Nutr.* 2004;92(5):757-61.
373. Monteleone P, Matias I, Martiadis V, De Petrocellis L, Maj M, Di Marzo V. Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacology.* 2005;30(6):1216-21.
374. Karakas SE. New biomarkers for diagnosis and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Chim Acta.* 2017;471:248-253.
375. Fanelli F, Di Lallo VD, Belluomo I, De Iasio R, Baccini M, Casadio E, et al. Estimation of reference intervals of five endocannabinoids and endocannabinoid related compounds in human plasma by two dimensional-LC/MS/MS. *J Lipid Res.* 2012;53(3):481-493.
376. Totorikaguena L, Olabarrieta E, Lolicato F, Romero-Aguirregomezcorcia J, Smitz J, Agirregoitia N, et al. The endocannabinoid system modulates the ovarian physiology and its activation can improve in vitro oocyte maturation. *J Cell Physiol.* 2020;235(10):7580-7591.
377. Habayeb OM, Taylor AH, Evans MD, Cooke MS, Taylor DJ, Bell SC, et al. Plasma levels of the endocannabinoid anandamide in women--a potential role in pregnancy maintenance and labor? *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5482-7.
378. Maia J, Almada M, Silva A, Correia-da-Silva G, Teixeira N, Sá SI, et al. The endocannabinoid system expression in the female reproductive tract is modulated by estrogen. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;174:40-47.
379. Brents LK. Marijuana, the Endocannabinoid System and the Female Reproductive System. *Yale J Biol Med.* 2016;89(2):175-91.
380. Balen AH, Morley LC, Misso M, Franks S, Legro RS, Wijeyaratne CN, et al. The management of anovulatory infertility in women with polycystic ovary syndrome: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance. *Hum Reprod Update.* 2016;22(6):687-708.
381. Kamnate A, Sirisin J, Polsan Y, Chomphoo S, Watanabe M, Kondo H, et al. In situ localization of diacylglycerol lipase α and β producing an endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol and of cannabinoid receptor 1 in the primary oocytes of postnatal mice. *J Anat.* 2021;238(6):1330-1340.
382. Kaya C, Pabuccu R, Berker B, Satiroglu H. Plasma interleukin-18 levels are increased in the polycystic ovary syndrome: relationship of carotid intima-media wall thickness and cardiovascular risk factors. *Fertil Steril.* 2010;93(4):1200-7.

383. Lindholm A, Blomquist C, Bixo M, Dahlbom I, Hansson T, Sundström et al. No difference in markers of adipose tissue inflammation between overweight women with polycystic ovary syndrome and weight-matched controls. *Hum Reprod.* 2011;26(6):1478-85.
384. Yang Y, Qiao J, Li R, Li MZ. Is interleukin-18 associated with polycystic ovary syndrome? *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:7.
385. Baht GS, Bareja A, Lee DE, Rao RR, Huang R, Huebner JL, et al. Meteorin-like facilitates skeletal muscle repair through a Stat3/IGF-1 mechanism. *Nat Metab.* 2020;2(3):278-289.
386. Hu C, Zhang X, Song P, Yuan YP, Kong CY, et al. Meteorin-like protein attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating cAMP/PKA/SIRT1 pathway. *Redox Biol.* 2020;37:101747.
387. Rupérez C, Ferrer-Curriu G, Cervera-Barea A, Florit L, Guitart-Mampel M, Garrabou G, et al. Meteorin-like/Meteorin- β protects heart against cardiac dysfunction. *J Exp Med.* 2021;218(5):e20201206.
388. AlKhairi I, Cherian P, Abu-Farha M, Madhoun AA, Nizam R, Melhem M, et al. Increased Expression of Meteorin-Like Hormone in Type 2 Diabetes and Obesity and Its Association with Irisin. *Cells.* 2019;8(10):1283.
389. Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):649.
390. Chang CL, Huang SY, Soong YK, Cheng PJ, Wang CJ, Liang IT. Circulating irisin and glucose-dependent insulinotropic peptide are associated with the development of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(12):E2539-48.
391. Li M, Yang M, Zhou X, Fang X, Hu W, Zhu W, et al. Elevated circulating levels of irisin and the effect of metformin treatment in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(4):1485-93. doi: 10.1210/jc.2014-2544. Epub 2015 Feb 12. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Aug;100(8):3219. PMID: 25675380.
392. Bostancı MS, Akdemir N, Cinemre B, Cevrioglu AS, Özden S, Ünal O. Serum irisin levels in patients with polycystic ovary syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(23):4462-8.
393. Adamska A, Karczewska-Kupczewska M, Lebkowska A, Milewski R, Górska M, Otziomek E, et al. Serum irisin and its regulation by hyperinsulinemia in women with polycystic ovary syndrome. *Endocr J.* 2016;63(12):1107-1112.
394. Pukajło K, Łaczmański Ł, Kolackov K, Kuliczowska-Płaksej J, Bolanowski M, Milewicz A, et al. Irisin plasma concentration in PCOS and healthy subjects is related to body fat content and android fat distribution. *Gynecol Endocrinol.* 2015;31(11):907-11.
395. Gao S, Cheng Y, Zhao L, Chen Y, Liu Y. The relationships of irisin with bone mineral density and body composition in PCOS patients. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016;32(4):421-8.
396. Abali R, Temel Yuksel I, Yuksel MA, Bulut B, Imamoglu M, Emirdar V, et al. Implications of circulating irisin and Fabp4 levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol.* 2016;36(7):897-901.
397. Wang C, Zhang XY, Sun Y, Hou XG, Chen L. Higher circulating irisin levels in patients with polycystic ovary syndrome:a meta-analysis. *Gynecol Endocrinol.* 2018;34(4):290-293.
398. Zhang J, Chen L, Ye J. Correlation analysis of myonectin levels with metabolic and hormonal disorders in patients with polycystic ovary syndrome. *Ann Palliat Med.* 2021;10(3):3404-3409.
399. Onat T, Inandiklioglu N, Kara M, Serdar Yalvac E, Turkler C, Ciplak B, Altindag MM. Increased serum myonectin and irisin levels with myonectin and FNDC5 expressions in polycystic ovary syndrome: a case control study. *J Obstet Gynaecol.* 2021:1-7.

400. Carbó N, López-Soriano J, Costelli P, Alvarez B, Busquets S, Baccino FM, et al. Interleukin-15 mediates reciprocal regulation of adipose and muscle mass: a potential role in body weight control. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1526(1):17-24.
401. Carbó N, López-Soriano J, Costelli P, Busquets S, Alvarez B, Baccino FM, et al. Interleukin-15 antagonizes muscle protein waste in tumour-bearing rats. *Br J Cancer*. 2000;83(4):526-31.
402. Sun H, Ma Y, Gao M, Liu D. IL-15/sIL-15R α gene transfer induces weight loss and improves glucose homeostasis in obese mice. *Gene Ther*. 2016;23(4):349-56.
403. López-Soriano J, Carbó N, Almendro V, Figueras M, Ribas V, Busquets S, López-Soriano FJ, Argilés JM. Rat liver lipogenesis is modulated by interleukin-15. *Int J Mol Med*. 2004;13(6):817-9.
404. Almendro V, Busquets S, Ametller E, Carbó N, Figueras M, Fuster G, et al. Effects of interleukin-15 on lipid oxidation: disposal of an oral [14 C]-triolein load. *BBA-Mol Cell Biol L*. 2006;1761(1):37-42.
405. Quinn LS, Anderson BG. Interleukin-15, IL-15 Receptor-Alpha, and Obesity: Concordance of Laboratory Animal and Human Genetic Studies. *J Obes*. 2011;2011:456347.
406. Kim HJ, Park JY, Oh SL, Kim YA, So B, Seong JK, et al. Effect of treadmill exercise on interleukin-15 expression and glucose tolerance in Zucker diabetic Fatty rats. *Diabetes Metab J*. 2013;37(5):358-64.
407. Marquez DX, Aguiñaga S, Vásquez PM, Conroy DE, Erickson KI, Hillman C, et al. A systematic review of physical activity and quality of life and well-being. *Transl Behav Med*. 2020;10(5):1098-1109.
408. Almendro V, Carbó N, Busquets S, López-Soriano J, Figueras M, Ametller E, et al. Interleukin-15 decreases lipid intestinal absorption. *Int J Mol Med*. 2005;15(6):963-7.