

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

ΜΟΝΑΔΑ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

Υπεύθυνος: Αγαθοκλής Τσατσούλης, Καθηγητής Παθολογίας/Ενδοκρινολογίας

Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΥΠΕΡΑΝΔΡΟΓΟΝΑΙΜΙΑΣ

ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΑ

ΝΕΚΤΑΡΙΑ Β. ΞΗΤΑ

ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2004



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

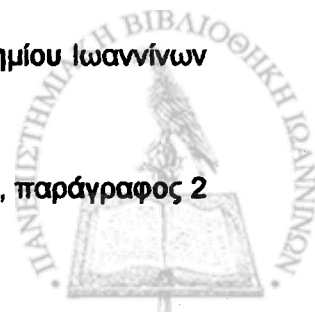


026000200212



**«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα».**

N. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2



Ημερομηνία αιτήσεως: 14-10-1997

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 3389/16-12-97

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων καθηγητής

Αγαθοκλής Τσατσούλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας/Ενδοκρινολογίας

Μέλη

Μωυσής Ελισάφ, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας

Ιωάννης Γεωργίου, Λέκτορας Μαιευτικής/Γυναικολογίας

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 27-3-2000

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: 22-12-2004

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αλέξανδρος Δρόσος, Καθηγητής Παθολογίας/Ρευματολογίας, μέλος

Μωυσής Ελισάφ, Καθηγητής Παθολογίας, μέλος

Κωνσταντίνος Σιαμόπουλος, Καθηγητής Παθολογίας/Νεφρολογίας, μέλος

Αγαθοκλής Τσατσούλης, Καθηγητής Παθολογίας/Ενδοκρινολογίας, επιβλέπων

Ιωάννης Γεωργίου, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και

Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής/Γυναικολογίας, μέλος

Ιωάννης Γουδέβενος, Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας, μέλος

Σοφία Καλανταρίδου, Επίκουρος Καθηγήτρια Μαιευτικής/Γυναικολογίας, μέλος

Η διδακτορική διατριβή έγινε αποδεκτή με βαθμό **«ΑΡΙΣΤΑ»**

Η Γραμματέας της Ιατρικής Σχολής

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



στους γονείς μου

στον αδερφό μου Γιάννη



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών αποτελεί τη συχνότερη ενδοκρινοπάθεια σε γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας. Είναι γνωστό ότι αποτελεί μια οικογενή διαταραχή, ωστόσο οι γενετικοί παράγοντες που συμβάλλουν στη παθογένεια του δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Πιστεύεται ότι περισσότερα από ένα γονίδια αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους αλλά και με περιβαλλοντικούς παράγοντες, κυρίως διατροφικούς, παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του συνδρόμου.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια προσπάθεια διερεύνησης της γενετικής βάσης του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών. Το πληθυσμό μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς που προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Μονάδας Ενδοκρινολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και η γενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής της Ανθρώπινης Αναπαραγωγής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή Αγαθοκλή Τσατσούλη και τον αναπληρωτή καθηγητή Ιατρικής Γενετικής Ιωάννη Γεωργίου, που μου έδωσαν την ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια, τις ουσιαστικές υποδείξεις και καθοδήγησή τους.

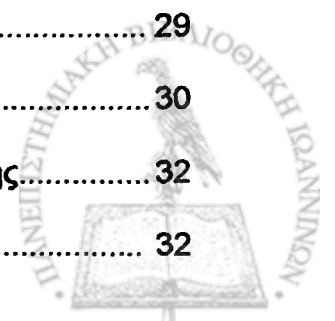
Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες της Μονάδας Ενδοκρινολογίας, τις παρασκευάστριες του Εργαστηρίου Γενετικής, Αλεξάνδρα Μπέλλου και Χρυσάνθη Κώστα για την πολύτιμη βοήθειά τους στο χώρο του εργαστηρίου, την Ανθούλα Χατζηκυριακίδου, βιολόγο, για την πρόθυμη βοήθεια της στο εργαστηριακό τμήμα της μελέτης και την Αφροδίτη Κατσαράκη, υπεύθυνη της στατιστικής υπηρεσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων που συνέβαλλε στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Τέλος, ιδιαίτερα ευχαριστώ την οικογένειά μου, που πέρα από την οικονομική τους υποστήριξη, στάθηκαν δίπλα μου με πολλή υπομονή, μοιράστηκαν τις αγωνίες και τις αμφιβολίες μου και μου έδωσαν την ενθάρρυνση που χρειαζόμουν.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ
1. Εισαγωγή	
1.1 Η σημασία της γενετικής στην ενδοκρινολογία.....	1
1.2 Η έννοια του γενετικού πολυμορφισμού.....	3
1.3 Μέθοδοι γενετικής ανάλυσης πολυπαραγοντικών νοσημάτων.....	5
1.3.1 Ανάλυση της γενετικής σύνδεσης (Linkage analysis).....	5
1.3.2 Μελέτες συσχέτισης (Association studies).....	6
2. Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (ΣΠΩ)	
2.1 Ορισμός – επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του ΣΠΩ.....	9
2.2 Κλινικά χαρακτηριστικά του ΣΠΩ.....	11
2.3 Εργαστηριακά ευρήματα του ΣΠΩ.....	12
2.3.1 Ορμονικές διαταραχές του ΣΠΩ	12
2.3.2 Μεταβολικές διαταραχές του ΣΠΩ.....	13
2.3.3 Υπερηχογραφική εικόνα ωοθηκών.....	15
2.4 Παθοφυσιολογία του ΣΠΩ.....	16
3. Γενετική βάση του ΣΠΩ.....	23
3.1 Γονίδια που εμπλέκονται στην έκκριση και δράση των γοναδοτροπινών....	26
3.1.1 Το γονίδιο της β-υποομάδας της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH-β).....	26
3.2 Γονίδια που εμπλέκονται στην έκκριση και δράση των ανδρογόνων.....	27
3.2.1 Το γονίδιο της 17α-υδροξυλάσης/17,20-λυάσης (CYP17).....	27
3.2.2 Το γονίδιο αποκοπής της πλάγιας αλύσου χοληστερόλης (CYP11a)..	28
3.2.3. Το γονίδιο της αρωματάσης (CYP19).....	29
3.2.4 Το γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR).....	30
3.3 Γονίδια που εμπλέκονται στην έκκριση και δράση της ινσουλίνης.....	32
3.3.1 Το γονίδιο της ινσουλίνης.....	32



3.3.2 Το γονίδιο του υποδοχέα της ινσουλίνης.....	34
3.4 Γονίδια που εμπλέκονται στην ωοθυλακιογένεση.....	36
3.4.1 Το γονίδιο της φολλιστατίνης.....	36
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	39
2. ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	42
3. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.	44
4. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	45
4.1 Εξαγωγή DNA από περιφερικά λευκοκύτταρα.....	46
4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	47
4.3 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	50
4.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	51
4.5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	51
4.6 Χρώση νιτρικού αργύρου.....	53
5. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ.	
5.1 Καθορισμός γονότυπων του πολυμορφισμού -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης.....	54
5.2 Καθορισμός γονότυπων του πολυμορφισμού 45T/G του γονιδίου της αδιπονεκτίνης.....	56
5.3. Καθορισμός γονότυπων του πολυμορφισμού 276G/T του γονιδίου της αδιπονεκτίνης.....	58
5.4 Καθορισμός γονότυπων του πολυμορφισμού (TAAAA) _n του γονιδίου της SHBG.....	60
6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	63
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	64
8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	79
9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	87



10. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	89
11. SUMMARY.....	93
12. Βιβλιογραφία.....	97



A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑ

Τις προηγούμενες δεκαετίες, οι ορμονικές εξετάσεις αποτέλεσαν το κύριο διαγνωστικό εργαλείο, αλλά και τη βάση της κλινικής έρευνας, στον τομέα της ενδοκρινολογίας. Η σημαντική ανάπτυξη των τεχνολογιών της μοριακής και κυτταρικής βιολογίας που ακολούθησε, συνέβαλλε στην κατανόηση της ορμονικής σύνθεσης, έκκρισης, ρύθμισης και δράσης σε κυτταρικό επίπεδο. Όμως, η αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γενετικού υλικού πρόσθεσε μια νέα διάσταση, που επιτρέπει την ευρεία εφαρμογή της γενετικής στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών πολλών ενδοκρινικών διαταραχών και συμβάλλει στην ασφαλή διάγνωση αλλά και πρόληψή τους.

Το ανθρώπινο γενετικό υλικό αποτελείται από περισσότερα από 3,5 δισεκατομμύρια νουκλεοτίδια, αλλά μόνο ένα μικρό ποσοστό (<2%) είναι υπεύθυνο για τη κωδικοποίηση πρωτεϊνών (1,2). Αν και, ακόμα και σήμερα, δεν γνωρίζουμε ακριβώς πόσα γονίδια περιέχει το ανθρώπινο DNA, εκτιμάται ότι περιλαμβάνει περίπου 30000-35000 γονίδια, αριθμός πολύ μικρότερος από ότι αρχικά είχε εκτιμηθεί (3). Από αυτά τα γονίδια, περισσότερο από το 50%, είναι θεωρητικές προβλέψεις βασιζόμενες σε ηλεκτρονική ανάλυση της αλληλουχίας του ανθρώπινου γενετικού υλικού και δεν έχουν διερευνηθεί πειραματικά (4). Ωστόσο, ένας σημαντικός αριθμός γονιδίων έχουν ταυτοποιηθεί ως υπεύθυνα για την πρόκληση νοσημάτων, μέσω της ύπαρξης μεταλλάξεων που διαταράσσουν την έκφραση ή τη λειτουργία του πρωτεϊνικού παραγώγου τους.

Σχεδόν κάθε νόσημα οφείλεται στην συνδυασμένη δράση γονιδίων και περιβάλλοντος, αλλά ο ρόλος του γενετικού παράγοντα ποικίλλει. Μεταξύ των



διαταραχών που προκαλούνται εξ ολοκλήρου ή εν μέρει από γενετικούς παράγοντες αναγνωρίζονται 3 κύριοι τύποι (5):

1. χρωματοσωμικές διαταραχές
2. μονογονιδιακές διαταραχές
3. πολυγονιδιακές - πολυπαραγοντικές διαταραχές

Στις χρωματοσωμικές ανωμαλίες, η διαταραχή οφείλεται σε περίσσεια ή έλλειψη γονιδίων που περιέχονται σε ολόκληρα χρωματοσώματα ή τμήματα χρωματοσωμάτων. Οι διαταραχές των χρωματοσωμάτων ήταν οι πρώτες που αναγνωρίστηκαν ως αιτίες ενδοκρινολογικών και αναπαραγωγικών νοσημάτων (για παράδειγμα τα σύνδρομα Klinefelter και Turner). Συνολικά οι χρωματοσωμικές ανωμαλίες είναι περισσότερο συχνές από τις μονογονιδιακές διαταραχές και εκδηλώνονται σε 7 περίπου ανά 1000 γεννήσεις, ενώ είναι υπεύθυνες για περίπου τις μισές από τις αυτόματες αποβολές κατά το πρώτο τρίμηνο της ζωής του εμβρύου (5). Οι μονογονιδιακές διαταραχές προκαλούνται από μεταλλαγμένα γονίδια και κληρονομούνται με το απλό μενδελιανό τρόπο. Για περισσότερα από εκατό χρόνια, ο αυτοσωματικός και φυλοσύνδετος τύπος κληρονομικότητας χρησιμοποιήθηκαν για να εξηγήσουν πολλές τέτοιες διαταραχές (5). Τα τελευταία χρόνια, εκτός από διαταραχές του χρωματοσωμικού DNA, έχουν περιγραφεί και άλλοι μηχανισμοί πρόκλησης μονογονιδιακών νοσημάτων, όπως οι γενετικές αλλαγές μιτοχονδριακών γονιδίων (6), οι διαταραχές της γονιδιακής αποτύπωσης, (imprinting, μηχανισμός με το οποίο η επίδραση ορισμένων γονιδίων εξαρτάται από το αν έχουν κληρονομηθεί από την μητέρα ή τον πατέρα) (7), η μονογονεϊκή δισωμία (uniparental disomy, μια σπάνια κατάσταση στην οποία και τα δύο χρωμοσώματα ενός από τα 23 ζεύγη προέρχεται από ένα γονιό) (8), και η επέκταση τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων (ένα φαινόμενο σύμφωνα με το οποίο μια αλληλουχία τριών βάσεων που φυσιολογικά επαναλαμβάνεται συγκεκριμένες φορές στο γονιδίωμα, επαναλαμβάνεται σε αυτές τις περιπτώσεις πάρα πολλές φορές και προκαλεί νόσο) (9).



Οι μονογονιδιακές διαταραχές παρουσιάζονται συνήθως με εμφανή και χαρακτηριστικό τρόπο στα γενεαλογικά δέντρα. Οι περισσότερες ανωμαλίες αυτού του είδους είναι σπάνιες, έχοντας συχνότητα που μπορεί να φθάσει το μέγιστο έως 1/500, αλλά συνήθως είναι πολύ μικρότερη (10). Ένας σημαντικός αριθμός ενδοκρινικών διαταραχών ανήκουν σε αυτή την κατηγορία (π.χ. συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων, MODY) και αποτελούν το απλούστερο και καλύτερα κατανοητό παράδειγμα συμβολής της γενετικής στην ενδοκρινολογία (11).

Στα πολυγονιδιακά νοσήματα υπάρχει ένας συνδυασμός γενετικών σφαλμάτων, που συνολικά μπορεί να προκαλέσουν ή να προδιαθέσουν ένα άτομο να αναπτύξει μια νόσο. Πολύ συχνά είναι δυνατόν να εμπλέκονται και περιβαλλοντικοί παράγοντες (πολυπαραγοντικά νοσήματα). Πρακτικά οι δύο όροι, πολυγονιδιακά και πολυπαραγοντικά νοσήματα, χρησιμοποιούνται ως συνώνυμοι. Οι πολυπαραγοντικές διαταραχές τείνουν να επανεμφανίζονται σε οικογένειες, αλλά δεν παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά πρότυπα των μονογονιδιακών νοσημάτων. Αυτό δε σημαίνει ότι παραβλέπονται οι κανόνες της μενδελιανής κληρονομικότητας, αλλά ο τρόπος κληρονομής δεν είναι τόσο απλός (5). Στην κατηγορία των πολυπαραγοντικών διαταραχών ανήκει η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης αλλά και το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

1.2 Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ

Ένα χαρακτηριστικό του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι ότι δύο μη συγγενικά άτομα έχουν κοινό το 99,9% της αλληλουχίας του DNA τους. Δεδομένου ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από περισσότερα από 3 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων, αυτή η ομολογία σημαίνει ότι τα δύο αυτά άτομα διαφέρουν σε εκατομμύρια βάσεις. Από το 0,1% των αλληλουχιών που διαφέρουν, οι περισσότερες αλλαγές αφορούν συνήθεις πολυμορφισμούς (12).

Ως γενετικός πολυμορφισμός ορίζεται η ύπαρξη πολλαπλών αλληλομόρφων σε ένα γενετικό τόπο, όπου τουλάχιστον δύο αλληλόμορφα εμφανίζονται με συχνότητα



μεγαλύτερη από 1%. Πρακτικά, πολυμορφικοί γενετικοί τόποι είναι εκείνοι για τους οποίους 2% των ατόμων του πληθυσμού είναι ετερόζυγα. Επίσης, κατά σύμβαση, αλληλόμορφα με συχνότητες μικρότερες του 1% καλούνται σπάνιες παραλλαγές και σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι μεταλλάξεις (5). Περισσότερο από το ένα τρίτο των γενετικών τόπων του ανθρώπου, που έχουν μελετηθεί, έχει βρεθεί ότι είναι πολυμορφικοί.

Η πλειοψηφία των πολυμορφισμών του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι σημειακοί πολυμορφισμοί (SNPs, single nucleotide polymorphisms) και απαντώνται σε συχνότητα περίπου ένας πολυμορφισμός κάθε 1000 ζεύγη βάσεων. Μια υποκατηγορία των SNPs είναι οι πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικού τμήματος (RFLPs, restriction fragment length polymorphisms), που προκαλούνται από την αντικατάσταση μιας βάσης από άλλη και δημιουργούν θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα (13).

Οι ποικίλου αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων πολυμορφισμοί (VNTRs, variable number of tandem repeats) αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και μπορεί να είναι μινιδορυφορικοί δείκτες (minisatellites) όταν οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είναι 10-60 ζεύγη βάσεων ή μικροδορυφορικοί δείκτες (microsatellites) που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες δύο, τριών ή τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Όταν ο αριθμός των επαναλήψεων των VNTR ποικίλλει στα διάφορα άτομα τότε ο γενετικός δείκτης θεωρείται πολυμορφικός (14).

Σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις, οι πολυμορφισμοί δεν συνδέονται άμεσα με μια συγκεκριμένη ασθένεια. Πολύ σπάνια ένας πολυμορφισμός επηρεάζει την έκφραση και σταθερότητα του γονιδίου του, ενώ η πλειοψηφία των πολυμορφισμών δεν έχει λειτουργική σημασία, αλλά δρουν συνεργικά με άλλους γενετικούς πολυμορφισμούς και συμβάλλουν έτσι στην ανάπτυξη πολυπαραγοντικών νοσημάτων.



1.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ.

Η πολυπλοκότητα της μελέτης των πολυπαραγοντικών νοσημάτων οφείλεται στο ότι η απλή σχέση γονότυπου και φαινότυπου δεν υφίσταται και έτσι ο ίδιος γονότυπος μπορεί να δώσει διαφορετικούς φαινοτύπους (λόγω περιβαλλοντικών επιδράσεων), αλλά και διαφορετικοί γονότυποι να δώσουν τον ίδιο φαινότυπο. Η ανακάλυψη των πολυμορφισμών που συμβάλλουν στην ανάπτυξη πολυπαραγοντικών νοσημάτων έχει μεγαλύτερη δυσκολία από την ανακάλυψη των μεταλλάξεων που προκαλούν μονογονιδιακές διαταραχές, αλλά έχει και μεγαλύτερο ενδιαφέρον, αν λάβει κανείς υπόψη την μεγάλη συχνότητα των πολυπαραγοντικών νοσημάτων.

Δύο μέθοδοι έχουν περιγραφεί για τη μεθοδική γενετική ανάλυση των πολυπαραγοντικών νοσημάτων:

1. η ανάλυση της γενετικής σύνδεσης (linkage analysis) και
2. οι μελέτες συσχέτισης (association studies)

1.3.1 Ανάλυση της γενετικής σύνδεσης (linkage analysis)

Η ανάλυση της γενετικής σύνδεσης είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της θέσης των υπεύθυνων γονιδίων σε μια ή περισσότερες οικογένειες που φέρουν ένα γενετικό νόσημα. Με αυτή τη μέθοδο γίνεται μελέτη της συν-κληρονομής ενός πολυμορφικού δείκτη και ενός γενετικού τόπου μιας ασθένειας. Βασίζεται στην αρχή ότι γενετικοί τόποι ή γονίδια που βρίσκονται πολύ κοντά, έχουν μικρή πιθανότητα να διαχωριστούν κατά τη διαδικασία της χιασματυπίας– ανασυνδυασμού. (συνδεδεμένοι γενετικοί τόποι ή συνδεδεμένα γονίδια) (15).

Ο πολυμορφικός δείκτης μελετάται στα μέλη μιας οικογένειας και αντιπαρατίθεται στην παρουσία ή απουσία μιας συγκεκριμένης ασθένειας. Τα στοιχεία που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του LOD score. Το LOD score είναι ο δεκαδικός λογάριθμος ενός κλάσματος, όπου αριθμητής είναι η πιθανότητα ο πολυμορφικός δείκτης και ο γενετικός τόπος της ασθένειας να είναι συνδεδεμένοι και παρανομαστής η πιθανότητα να μην είναι συνδεδεμένοι. Επειδή η ακριβής απόσταση



του πολυμορφικού δείκτη και του γενετικού τόπου δεν είναι γνωστή, ο πιθανός ανασυνδυασμός τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αδρή μέτρηση της απόστασης τους. Έτσι, αν ο γενετικός τόπος μιας ασθένειας βρίσκεται κοντά σε ένα πολυμορφικό δείκτη του οποίου η κληρονόμηση μπορεί να μελετηθεί σε μία οικογένεια, είναι δυνατό να προβλέψει κανείς ποια μέλη της οικογένειας κινδυνεύουν να αναπτύξουν τη νόσο, ακολουθώντας απλά την κληρονόμηση του πολυμορφικού δείκτη. Η πιθανότητα λάθους είναι συνάρτηση της απόστασης του πολυμορφικού δείκτη και του γενετικού τόπου της ασθένειας.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ικανότητα της εντόπισης ενός γενετικού τόπου υπεύθυνου για μία ασθένεια, χωρίς να είναι απαραίτητη η προηγούμενη γνώση ή υπόθεση για γονίδια που εμπλέκονται στην συγκεκριμένη ασθένεια. Μολονότι η ανάλυση της γενετικής σύνδεσης μπορεί να χαρτογραφήσει την περιοχή όπου βρίσκονται το υπεύθυνο γονίδιο για την πρόκληση μιας ασθένειας, δεν μπορεί να καθορίσει ποιο από όλα τα γονίδια αυτής της περιοχής είναι το υπεύθυνο. Επιπλέον, για να υπάρχουν ασφαλή συμπεράσματα με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου, πρέπει ο αριθμός των μελών των υπό μελέτη οικογενειών να είναι ικανοποιητικός, ο φαινότυπος να είναι καθορισμένος με ακρίβεια και το μοντέλο κληρονόμησης να είναι γνωστό, αν και τελευταία έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ανάλυσης γενετικής σύνδεσης όπου το μοντέλο κληρονόμησης δεν θεωρείται απαραίτητο να είναι γνωστό (μη παραμετρικές μέθοδοι, π.χ. η ανάλυση ζεύγους αδερφών (sib-pair analysis), 16).

Η ανάλυση της γενετικής σύνδεσης είναι ιδιαίτερα σημαντική μέθοδος για τη μελέτη μονογονιδιακών νοσημάτων και λιγότερο σημαντική όσον αφορά τα πολυγονιδιακά νοσήματα όπου η συμμετοχή του κάθε γονιδίου είναι μέτρια.

1.3.2 Μελέτες συσχέτισης (association studies)

Οι μελέτες συσχέτισης αποτελούν τη συχνότερη προσέγγιση για την ταυτοποίηση γενετικών επιδράσεων στα πολυπαραγοντικά νοσήματα. Με αυτή τη μέθοδο



συγκρίνονται οι συχνότητες των αλληλομόρφων ενός συγκεκριμένου πολυμορφισμού μεταξύ των πασχόντων και μη, ενός πληθυσμού (association or case-control studies), σε αντίθεση με την ανάλυση της γενετικής σύνδεσης η οποία μελετάει τα μέλη οικογενειών (17).

Οι μελέτες συσχέτισης γίνονται για τη διερεύνηση γονιδίων που σύμφωνα με την παθοφυσιολογική βάση της υπό-μελέτη ασθένειας θεωρούνται ως υποψήφια και εξετάζουν αν κάποιο αλληλόμορφο έχει μεγαλύτερη συχνότητα σε πάσχοντα άτομα σε σχέση με μη πάσχοντα άτομα. Αυτές οι μελέτες έχουν πολύ καλή εφαρμογή στη διερεύνηση νοσημάτων των οποίων το μοντέλο κληρονομησης δεν είναι γνωστό και έχουν ετερογενή φαινότυπο.

Μια θετική συσχέτιση μπορεί να παρατηρηθεί για τρεις λόγους (18):

1. αν ένα αλληλόμορφο είναι πραγματικά ο παθογενετικός παράγοντας μιας νόσου και στην περίπτωση αυτή η θετική συσχέτιση θα πρέπει να επιβεβαιωθεί σε όλους τους πληθυσμούς.
2. αν ένα αλληλόμορφο δεν προκαλεί τη νόσο αλλά βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με γενετικό τόπο που προκαλεί την ασθένεια. Λέγοντας ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) είναι η επιλεκτική σύνδεση ενός αλληλομόρφου με γειτονικό γενετικό τόπο σε συχνότητα μεγαλύτερη από ότι θα αναμένονταν με βάση τον παράγοντα τύχη.
3. Τέλος μπορεί μία συσχέτιση να είναι ψευδώς θετική αν ο πληθυσμός μελέτης είναι ετερογενής. Σε ένα μη ομοιογενή πληθυσμό κάθε χαρακτηριστικό που συναντάται συχνά σε μια ομάδα θα δείξει θετική συσχέτιση με οποιοδήποτε αλληλόμορφο τυχαίνει να απαντάται επίσης συχνά σε αυτήν την ομάδα.

Ένας τρόπος να αποφευχθεί η ψευδώς θετική συσχέτιση, που οφείλεται στην ετερογένεια του πληθυσμού είναι να χρησιμοποιηθούν ως ομάδα ελέγχου τα μη πάσχοντα μέλη της οικογένειας του πάσχοντα (19).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μοντέλα που βασίζονται σε μελέτες οικογενειών (έλεγχος ανισορροπίας σύνδεσης σε οικογενειακού χαρακτήρα



μελέτες, Family-based linkage disequilibrium tests). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ανάλυση ανισορροπίας μεταβίβασης αλληλομόρφων (Transmission Disequilibrium test, TDT), σύμφωνα με την οποία ελέγχεται αν οι ετερόζυγοι γονείς μεταφέρουν πιο συχνά το υπεύθυνο για τη νόσο αλληλόμορφο στα πάσχοντα παιδιά τους (20). Αρχικά αυτής της κατηγορίας οι μελέτες χρησιμοποιήθηκαν για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των μελετών συσχέτισης, πλέον όμως θεωρούνται επαρκείς και ως αρχική μέθοδο μελέτης γενετικών νοσημάτων (21).



2. ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΩΝ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ (ΣΠΩ)

2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ - ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΣΠΩ

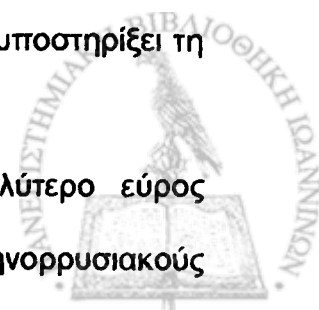
Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (ΣΠΩ) είναι η συχνότερη αιτία υπερανδρογοναιμίας και η πιο συχνή ενδοκρινοπάθεια σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (22,23). Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Stein και Leventhal το 1935, οι οποίοι παρατήρησαν την ύπαρξη πολυκυστικών ωοθηκών σε γυναίκες παχύσαρκες με αμηνόρροια και δασυτριχισμό (24).

Το ΣΠΩ είναι σύνδρομο και όχι νόσος και αυτό αντανακλά την ετερογένεια της κλινικής εικόνας και την πιθανότητα ύπαρξης πολλών αιτιοπαθογενετικών μηχανισμών (25). Όσον αφορά τον ορισμό του συνδρόμου δεν υπάρχει ομοφωνία, δεδομένου ότι δεν υφίσταται κάποιος σταθερός κλινικός ή βιοχημικός δείκτης που να παρατηρείται μόνο σε αυτό το σύνδρομο και να το διακρίνει από άλλες μορφές υπερανδρογοναιμίας. Οι περισσότεροι χρησιμοποιούν τα κριτήρια που δόθηκαν στο συνέδριο του ΣΠΩ από το National Institutes of Health-National Institute of Child Health and Human Development (NIH-NICHD) το 1990 (26). Αυτά είναι:

- χρόνια ανωοθυλακιορρηξία,
- υπερανδρογοναιμία, κλινική (υπερτρίχωση, ακμή ή αλωπεκία ανδρογενετικού τύπου) ή/και βιοχημική (αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων),
- αποκλεισμός άλλων νόσων που προκαλούν υπερανδρογοναιμία (μη κλασσική συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων, σύνδρομο Cushing, υπερπρολακτιναιμία, θυρεοειδική δυσλειτουργία και αρρενοποιητικοί όγκοι των ωοθηκών και των επινεφριδίων).

Επομένως, φαίνεται ότι η διάγνωση του συνδρόμου είναι διάγνωση εξ αποκλεισμού. Επίσης, σε αυτά τα κριτήρια δεν συμπεριλαμβάνεται η υπερηχογραφική διάγνωση πολυκυστικών ωοθηκών, η οποία τότε θεωρήθηκε ανεπαρκής για να υποστηρίξει τη διάγνωση του συνδρόμου.

Ωστόσο, σήμερα έχει γίνει σαφές ότι το ΣΠΩ περικλείει μεγαλύτερο εύρος φαινοτύπων. Πλέον υποστηρίζεται ότι γυναίκες με κανονικούς εμμηνορρυσιακούς



κύκλους και υπερανδρογοναιμία και/ή πολυκυστική μορφολογία ωοθηκών έχουν ΣΠΩ (27). Επίσης, υπάρχουν γυναίκες με ΣΠΩ με πολυκυστική μορφολογία ωοθηκών και ωοθηκική δυσλειτουργία, χωρίς να έχουν κλινικά σημεία υπερανδρογοναιμίας (28). Ως αποτέλεσμα το 2003, the Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group αναθεώρησε τα κριτήρια και συμπεριέλαβε την πολυκυστική μορφολογία ωοθηκών (29). Σύμφωνα με αυτή την αναθεώρηση τα κριτήρια που προτείνονται για τη διάγνωση του ΣΠΩ είναι:

- Ολιγο- και/ή ανωθυλακιορρηξία
- Κλινικά και/ή βιοχημικά ευρήματα υπερανδρογοναιμίας
- Πολυκυστική μορφολογία ωοθηκών

Για τη διάγνωση του συνδρόμου απαιτείται να υπάρχουν τα δύο από τα τρία αυτά κριτήρια. Επίσης, σύμφωνα και με αυτή την αναθεώρηση, το σύνδρομο εξακολουθεί να είναι μια διάγνωση εξ αποκλεισμού, καθώς θα πρέπει να αποκλειστούν άλλες γνωστές καταστάσεις που προκαλούν φαινότυπο ΣΠΩ.

Η συχνότητα του ΣΠΩ υπολογίζεται στο 4,6% και κυμαίνεται από 3,5-11,2% (23). Στις ΗΠΑ, η συχνότητα δεν διαφέρει ανάμεσα στις γυναίκες της καυκάσιας και μαύρης φυλής και υπολογίζεται στο 4%, ενώ στην Ελλάδα εκτιμάται στο 6,8% και παρόμοια είναι και η συχνότητα στην Ισπανία (22,23,30). Χαρακτηριστικό είναι ότι υπάρχουν σημαντικές εθνικές και φυλετικές διαφορές όσον αφορά τις κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου. Έτσι, έχει βρεθεί ότι οι Ιαπωνέζες με ΣΠΩ είναι λιγότερο παχύσαρκες και με μικρότερο βαθμό υπερτρίχωσης σε σχέση με ασθενείς από τις ΗΠΑ και την Ιταλία, αν και τα επίπεδα των ανδρογόνων και οι δείκτες αντίστασης στην ινσουλίνη δεν διαφέρουν σε αυτούς τους πληθυσμούς (31). Οι Dunaif et al (32) συνέκριναν ασθενείς καραϊβικής-ισπανικής καταγωγής με καυκάσιες-μη ισπανικής καταγωγής και διαπίστωσαν ότι η πρώτη ομάδα είχε μεγαλύτερου βαθμού αντίσταση στην ινσουλίνη. Επίσης, η επίδραση της εθνικότητας στην κλινική εκδήλωση του συνδρόμου φαίνεται και από τη σύγκριση ευρωπαϊών γυναικών με γυναίκες από τα νησιά του Ειρηνικού Ωκεανού, όπου βρέθηκε ότι οι ευρωπαϊκές είναι λιγότερο

παχύσαρκες, με μικρότερη αντίσταση στην ινσουλίνη, με καλύτερο λιπιδαιμικό προφίλ και λιγότερο υπογονιμες από τη δεύτερη ομάδα (33).

2.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΣΠΩ

Το κλινικό φάσμα του ΣΠΩ είναι ετερογενές. Τα 2/3 έχουν συμπτώματα ανωθυλακιορρηξίας (που μπορεί να ποικίλλουν από oligo/αμηνόρροια έως δυσλειτουργικές αιμορραγίες και υπογονιμότητα), τα 2/3 των ασθενών εμφανίζουν κλινικά σημεία υπερανδρογοναιμίας (υπερτρίχωση, ακμή, λιπαρότητα του δέρματος αλωπεκία ανδρογενετικού τύπου), και το 1/2 είναι παχύσαρκες γυναίκες με ανδροειδή τύπο παχυσαρκίας. Συνεπώς, μόνο το 1/3 εμφανίζουν την κλασσική εικόνα του συνδρόμου (εικόνα 1) (34).



Εικόνα 1. Κλινικό φάσμα του ΣΠΩ

Επιπλέον στο 5-10% των φυσιολογικού σωματικού βάρους γυναικών με ΣΠΩ και στο 50% των παχύσαρκων γυναικών με ΣΠΩ παρατηρείται μελανίζουσα ακάνθωση (35).

Η παρουσία μελανίζουσας ακάνθωσης σε γυναίκα με δασυτριχισμό αποτελεί χρήσιμο κλινικό δείκτη ενδεικτικό του ΣΠΩ, που το διαφοροδιαγνώσκει από ανδρογονοεκκριτικούς όγκους (εικόνα 2)(36).





Εικόνα 2. Ύπαρξη μελανίζουσας ακάνθωσης στον αυχένα (Α) και την μασχαλαία χώρα (Β) σε γυναίκα με ΣΠΩ.

Το ΣΠΩ συνήθως εμφανίζεται από την εμμηναρχή. Η πιο πρώιμη εκδήλωση του συνδρόμου είναι η πρώιμη αδρεναρχή. Ειδικά τα κορίτσια που εμφανίζουν πρώιμη αδρεναρχή και έχουν αυξημένα επίπεδα DHEAS και υπερινσουλιναίμια έχουν υψηλό κίνδυνο να αναπτύξουν φαινότυπο ΣΠΩ αργότερα (37). Έχει παρατηρηθεί, ότι στην ηλικία των 40 υπάρχει ένα «παράθυρο», όπου βελτιώνεται τόσο η υπερανδρογοναμία όσο και η κανονικότητα των εμμηνορρυσιακών κύκλων (38,39).

2.3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΣΠΩ

2.3.1. Ορμονικές διαταραχές του ΣΠΩ

Όπως συμβαίνει με την κλινική εικόνα έτσι και με τα εργαστηριακά ευρήματα το ΣΠΩ χαρακτηρίζεται από σημαντική ετερογένεια. Οι κύριες ορμονικές διαταραχές του συνδρόμου είναι η διαταραχή της έκκρισης των γοναδοτροπινών και φυσικά η υπερανδρογοναίμια.

Πληθώρα παρατηρήσεων συνηγορούν στο ότι οι γυναίκες με ΣΠΩ παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ωχρινότροπου ορμόνης (LH) πλάσματος, σε ποσοστό που κυμαίνεται από 30-90%. Αυτό το μεγάλο εύρος της συχνότητας οφείλεται στις μεθόδους προσδιορισμού των γοναδοτροπινών, καθώς και στην ώρα της



δειγματοληψίας, μιας και η έκκριση των γοναδοτροπινών είναι κατά ώσεις και μεμονωμένα δείγματα στο ναδίρ ή το ζενίθ μπορεί να δώσουν διαφορετικά αποτελέσματα (40). Εκτός όμως από τα αυξημένα επίπεδα, υπάρχει και διαταραχή του προτύπου έκκρισης της LH, μιας και στις ασθενείς με ΣΠΩ παρατηρούνται μεγαλύτερης συχνότητας ώσεις έκκρισης LH σε σχέση με τις υγιείς γυναίκες (41). Όσον αφορά τη θυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH), οι γυναίκες με ΣΠΩ έχουν φυσιολογικά ή ελαφρώς ελαττωμένα επίπεδα σε σχέση με τις υγιείς γυναίκες. Ως αποτέλεσμα, ο λόγος LH/FSH μπορεί να είναι αυξημένος στο ΣΠΩ (περίπου 2,5:1) και παλιότερα είχε θεωρηθεί ως χαρακτηριστικό του συνδρόμου, αλλά πλέον έχει βρεθεί ότι παρατηρείται μόνο στο 30% των περιπτώσεων και ιδιαίτερα στις φυσιολογικού σωματικού βάρους (42).

Η υπερανδρογοναιμία αποτελεί την πλέον συχνή διαταραχή του συνδρόμου, αν και τα επίπεδα των ανδρογόνων, όπως συμβαίνει και με την LH, μπορεί να είναι εντός των φυσιολογικών ορίων (43). Η βιοδιαθεσιμότητα και η κάθαρση της τεστοστερόνης επηρεάζεται από τη συγκέντρωση της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης (SHBG), στα επίπεδα της οποίας ρυθμιστικό ρόλο παίζουν κυρίως οι ορμόνες του φύλου και η ινσουλίνη (44). Στο ΣΠΩ, τα επίπεδα της SHBG είναι χαμηλά, με αποτέλεσμα το επίπεδο των βιολογικά δραστικών ανδρογόνων να είναι υψηλό, μολονότι μπορεί η ολική τεστοστερόνη να είναι φυσιολογική (45). Σημαντικό είναι ότι στο 25% των γυναικών με ΣΠΩ εκτός από τα ωοθηκικά είναι αυξημένα και τα επίπεδα των επινεφριδικών ανδρογόνων (46).

2.3.2 Μεταβολικές διαταραχές του ΣΠΩ

Αν και αρχικά το ΣΠΩ θεωρήθηκε ως η κλινική οντότητα συνύπαρξης ανωθυλακιορρηξίας και υπερανδρογοναιμίας, σήμερα πιστεύεται ότι αποτελεί μέρος του μεταβολικού συνδρόμου (σύνδρομο ΧΧ) (47). Πιστεύεται ότι οι παχύσαρκες, αλλά και φυσιολογικού σωματικού βάρους γυναίκες με ΣΠΩ, παρουσιάζουν αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη σε σύγκριση με φυσιολογικές γυναίκες αντίστοιχης ηλικίας

και σωματικού βάρους (48,49). Επομένως, υπάρχουν δύο παράμετροι που συμβάλλουν στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη στο ΣΠΩ, μία παράμετρος που είναι μοναδική για το σύνδρομο και μία παράμετρος που σχετίζεται με το σωματικό βάρος.

Στο ΣΠΩ συνυπάρχει σε κάποιο ποσοστό και διαταραχή της λειτουργίας του β-κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, οι γυναίκες με ΣΠΩ εμφανίζουν αυξημένη έκκριση ινσουλίνης σε βασικές καταστάσεις και ελαττωμένη μεταγευματική έκκριση, αδυνατώντας έτσι να αντισταθμίσουν την αντίσταση στην ινσουλίνη (50). Το αποτέλεσμα είναι ότι το 20-40% των παχύσαρκων γυναικών με ΣΠΩ και το 12% των ασθενών με φυσιολογικό σωματικό βάρος εμφανίζουν διαταραχή ανοχής γλυκόζης ή σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 μέχρι το τέλος της 4^{ης} δεκαετίας της ζωής τους σε σύγκριση με το 10% του γενικού πληθυσμού γυναικών αντίστοιχης ηλικίας (51,52).

Στο ΣΠΩ παρατηρούνται επίσης διαταραχές των λιπιδίων. Συγκεκριμένα το λιπιδαιμικό προφίλ των γυναικών με ΣΠΩ χαρακτηρίζεται από μειωμένα επίπεδα HDL-χοληστερόλης και αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων (53). Αυτά τα ευρήματα ωστόσο ποικίλλουν και εξαρτώνται από την ύπαρξη παχυσαρκίας, τη διατροφή και την εθνικότητα του πληθυσμού μελέτης. Φαίνεται ότι μείζονες παράγοντες δυσλιπιδαιμίας σε αυτές τις γυναίκες είναι η υπερανδρογοναιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη (53). Αν στην αντίσταση στην ινσουλίνη και την δυσλιπιδαιμία προστεθεί η υπέρταση και η διαταραχή των ινωδολυτικών μηχανισμών που παρατηρείται στις γυναίκες με ΣΠΩ, δικαιολογείται η αυξημένη συχνότητα αθηροσκλήρωσης και ο αυξημένος κίνδυνος για καρδιαγγειακή νόσο σε αυτές τις γυναίκες (54, 55). Εκτιμάται ότι οι γυναίκες με ΣΠΩ έχουν επτά φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου από το γενικό γυναικείο πληθυσμό και για αυτό είναι κυρίως υπεύθυνη η αντίσταση στην ινσουλίνη (56,57).



2.3.3. Υπερηχογραφική εικόνα ωοθηκών

Σύμφωνα με την αναθεώρηση των κριτηρίων διάγνωσης του 2003 (29), στα κριτήρια συμπεριλήφθηκε και η πολυκυστική εμφάνιση των ωοθηκών κατά των υπερηχογραφικό έλεγχο. Για το χαρακτηρισμό της πολυκυστικής ωοθήκης απαραίτητη θεωρείται η παρουσία περισσότερων των 12 θυλακίων, διαμέτρου 2-9mm σε κάθε ωοθήκη, και/ή συνύπαρξη αυξημένου μεγέθους ωοθήκης (>10ml) (εικόνα 3) (58). Η διαπίστωση αυτής της μορφολογίας σε μία μόνο ωοθήκη αρκεί για να τεθεί η διάγνωση των πολυκυστικών ωοθηκών. Σύμφωνα με αυτό το χαρακτηρισμό, η κυκλική διάταξη των θυλακίων, που παλιότερα θεωρήθηκε απαραίτητη, δεν λαμβάνεται πλέον υπόψη. Μία γυναίκα που έχει εικόνα πολυκυστικών ωοθηκών κατά τον υπερηχογραφικό έλεγχο απουσία ωοθηκικής δυσλειτουργίας και υπερανδρογοναιμίας (ασυμπτωματικές πολυκυστικές ωοθήκες) δεν πρέπει να θεωρείται ότι έχει ΣΠΩ, μιας και αυτό το εύρημα παρατηρείται στο 20% των υγιών γυναικών (59).



Εικόνα 3 Υπερηχογραφική και ιστολογική εικόνα πολυκυστικής ωοθήκης

2.4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΣΠΩ

Η παθογένεια του συνδρόμου δεν έχει απόλυτα διευκρινιστεί. Έχουν προταθεί τρεις υποθέσεις για την ερμηνεία της παθοφυσιολογίας του συνδρόμου. Αυτές είναι: η κεντρική υπόθεση [υπόθεση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH)], η περιφερική υπόθεση (ωθηκική ή επινεφριδική) και η υπόθεση της ινσουλίνης (60).

- Κεντρική υπόθεση ή υπόθεση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (υπόθεση LH).

Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, στις γυναίκες με ΣΠΩ υπάρχει μια πρωτοπαθής νευροενδοκρινική διαταραχή, που είναι υπεύθυνη για την αύξηση του ύψους και της συχνότητας των ώσεων έκκρισης της LH, με αποτέλεσμα την υπερδιέγερση παραγωγής ανδρογόνων από τα κύτταρα θήκης των ωθηκών και την πρόκληση ανωοθυλακιορρηξίας (60).

Είναι γνωστό ότι η συχνότητα και το ύψος των ώσεων της GnRH είναι αυτό που καθορίζει την έκκριση των γοναδοτροπινών. Βραχείας συχνότητας ώσεις GnRH ευνοούν την έκκριση της FSH, ενώ ταχείας συχνότητας ώσεις ευνοούν την έκκριση της LH. Επομένως διαταραχή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης με αυξημένο ρυθμό έκκρισης της GnRH έχει ως αποτέλεσμα υπεροχή της έκκρισης της LH με σχετική ανεπάρκεια της FSH, όπως συμβαίνει στο ΣΠΩ (61).

Δεν έχει καθοριστεί αν η υποθαλαμική διαταραχή που εκφράζεται με διαταραχή των ώσεων της GnRH είναι πρωτοπαθής υποθαλαμική βλάβη και το πιθανότερο είναι να είναι δευτεροπαθής άλλων ορμονικών και μεταβολικών διαταραχών, όπως της υπερινσουλιναμίας (62).

Η υπόθεση αυτή δεν μπορεί να εξηγήσει όλη την παθογένεια του ΣΠΩ, ούτε την εμφάνιση του συνδρόμου σε ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα LH. Επιπλέον, παρόμοιες διαταραχές της έκκρισης των γοναδοτροπινών παρατηρούνται και σε άλλες υπερανδρογοναιμικές καταστάσεις, όπως για παράδειγμα στη συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων (63). Επομένως ανεξάρτητα της αιτίας, η υπερέκκριση



της LH συμβάλλει στη διέγερση των κυττάρων του στρώματος και της θήκης των ωθηκών οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων

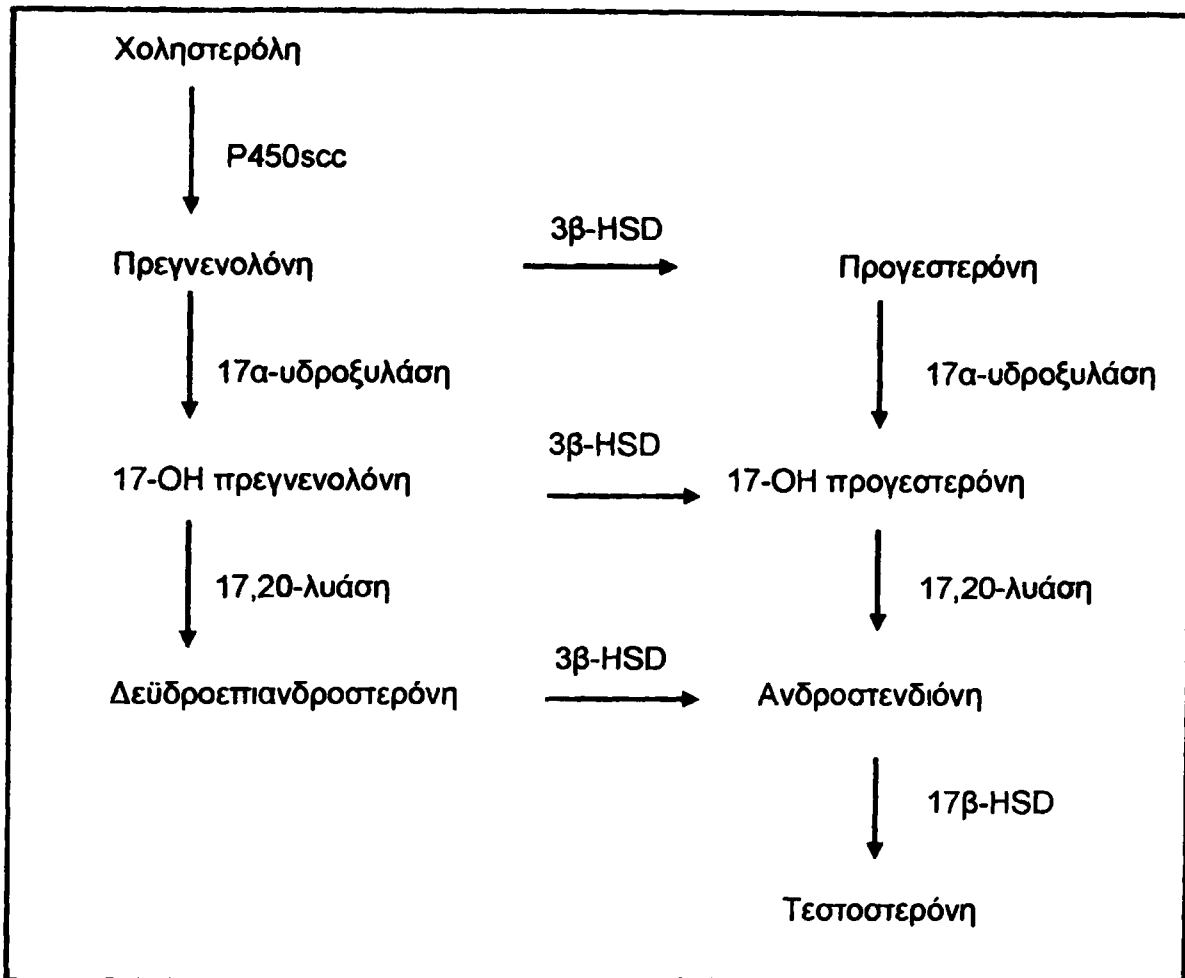
- Περιφερική υπόθεση (ωθηκική ή επινεφριδική υπόθεση).

Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση το αίτιο για την ανάπτυξη του ΣΠΩ είναι η πρωτοπαθής βλάβη της στεροειδογένεσης, που οδηγεί σε υπερβολική έκκριση ανδρογόνων και ανωθυλακιορρηξία (60).

Η ωθήκη και τα επινεφρίδια έχουν κοινό το αρχικό τμήμα της οδού βιοσύνθεσης των στεροειδών (εικόνα 4). Το αρχικό βήμα αυτής της οδού είναι η μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη με τη βοήθεια του ενζύμου αποκοπής της πλάγιας αλυσού της χοληστερόλης (cholesterol side chain cleavage enzyme, P450_{scc}). Η ταχύτητα αυτής της διαδικασίας εξαρτάται από την μεταφορά της χοληστερόλης στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη, αντίδραση που καταλύεται από την οξεία στεροειδογενετική ρυθμιστική πρωτεΐνη (StAR). Στη συνέχεια η πρεγνενολόνη μέσω της οδού των Δ⁵-στεροειδών μετατρέπεται σε 17-κετοστεροειδική δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA). Σημαντικό ρόλο σε αυτό το βήμα παίζει το κυτόχρωμα P450_{c17}, που έχει δράσεις 17α-υδροξυλάσης και 17,20-λυάσης. Παράλληλα η πρεγνενολόνη, μέσω της οδού των Δ⁴-στεροειδών, μετατρέπεται σε ανδροστενεδιόνη (64).

Η ενδοωθηκική συγκέντρωση των ανδρογόνων είναι σημαντική για τη λειτουργία της ωθήκης. Από την μία, τα ανδρογόνα είναι απαραίτητα υποστρώματα για τη βιοσύνθεση των οιστρογόνων και την ανάπτυξη των μικρών θυλακίων, από την άλλη όμως, όταν η συγκέντρωσή τους είναι ιδιαίτερα αυξημένη εμποδίζεται η ωθυλακική ωρίμανση που οδηγεί σε ανάδειξη κυρίαρχου ωθυλακίου, ενώ ταυτόχρονα προκαλείται υπερπλασία του στρώματος της ωθήκης (65). Φαίνεται έτσι ότι η ωθηκική σύνθεση των ανδρογόνων πρέπει να διατηρείται στο ελάχιστο επίπεδο που απαιτείται για την ανάπτυξη των θυλακίων.





Εικόνα 4. Οδός βιοσύνθεσης των ανδρογόνων (P450scc: ενζυμο αποκοπής της πλάγιας αλύσου της χοληστερόλης, 3β-HSD: 3β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση και Δ^5 -ισομεράση, 17β-HSD: 17β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση)

Σύμφωνα με την περιφερική ωθητική υπόθεση, υπεύθυνη για τη παθογένεια του ΣΠΩ θα μπορούσε να είναι μια διαταραχή της λειτουργίας του κυτοχρώματος P450c17 (ρυθμιστικό στάδιο της βιοσύνθεσης των ανδρογόνων), που θα οδηγούσε σε αυξημένη σύνθεση ανδρογόνων (66). Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι σε περίπου το 80% των γυναικών με ΣΠΩ υπάρχει ωθητική υπερανδρογοναιμία, που συνίσταται σε γενικευμένη ωθητική υπεραπαντητικότητα στη δράση των γοναδοτροπινών. Ως αποτέλεσμα, οι γυναίκες με ΣΠΩ έχουν αυξημένη σύνθεση 17α-υδροξυπρογεστερόνης (17-OHP) και ανδροστενεδιόνης ως απάντηση στην LH (67). Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε και σε *in vitro* πειράματα, σε καλλιέργειες

κυττάρων θήκης ωοθηκών από γυναίκες με ΣΠΩ, στις οποίες βρέθηκε αυξημένη παραγωγή ανδροστενεδιόνης και επιπλέον η προσθήκη LH σε αυτές τις κυτταροκαλλιέργειες δεν μετέβαλλε το κλάσμα ανδροστενεδιόνης/προγεστερόνης, αποδεικνύοντας έτσι, ότι αυτή η υπερπαραγωγή δεν οφείλεται στις αυξημένες συγκεντρώσεις LH που μπορεί να παρατηρηθούν στο ΣΠΩ in vivo (68).

Το κυτόχρωμα P450c17 συμμετέχει στη βιοσύνθεση των ανδρογόνων, τόσο στις ωοθήκες όσο και στα επινεφρίδια. Επομένως διαταραχή της λειτουργίας του θα μπορούσε να προκαλέσει αύξηση της σύνθεσης των ανδρογόνων και από τα επινεφρίδια. Έχει βρεθεί ότι περίπου το 50% των ασθενών με ΣΠΩ παρουσιάζουν επίσης ένα χαρακτηριστικό πρότυπο επινεφριδικής δυσλειτουργίας που συνίσταται σε μέτρια υπεραπανθητικότητα των 17-κετοστεροειδών και ειδικότερα της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA) στην ACTH (69).

Αν και η πιθανότερη εκδοχή για την πρόκληση της επινεφριδικής υπερανδρογοναιμίας είναι η ενζυματική διαταραχή της στεροειδογένεσης, τα τελευταία χρόνια έχει υποστηριχθεί και ο πιθανός ρόλος της διαταραχής του μεταβολισμού της κορτιζόλης στη παθογένεια του ΣΠΩ. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία ο αυξημένος περιφερικός μεταβολισμός της κορτιζόλης είτε λόγω αυξημένης αδρανοποίησής της (μέσω αυξημένης δραστηριότητας της 5α-αναγωγάσης), είτε λόγω μειωμένης μετατροπής της από κορτιζόνη (μέσω διαταραχής της 11βHSD), οδηγεί σε αντισταθμιστική αύξηση της έκκρισης της ACTH (μέσω ελάττωσης του αρνητικού feedback), προκειμένου να διατηρηθούν φυσιολογικά τα επίπεδα της κορτιζόλης εις βάρος των επινεφριδικών ανδρογόνων (70-72). Ωστόσο ο μηχανισμός της διαταραχής της λειτουργίας της 5α-αναγωγάσης και της 11βHSD στο ΣΠΩ και η πιθανή συμμετοχή της παχυσαρκίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Αν και τα επινεφριδικής προέλευσης ανδρογόνα είναι αυξημένα στο 20% των γυναικών με ΣΠΩ (46), οι ωοθήκες αποτελούν τον κύριο παράγοντα που συμβάλλει στην υπερανδρογοναιμία του συνδρόμου.

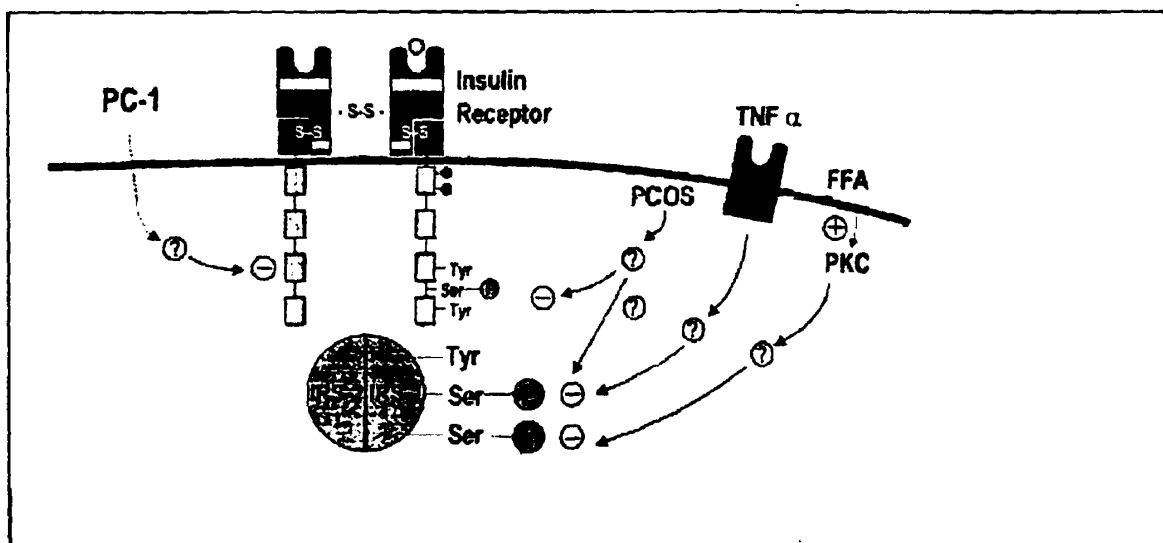


-Υπόθεση της ινσουλίνης

Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, βλάβη στη δράση και/ή έκκριση της ινσουλίνης προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη με ανηρροπαστική υπερινσουλαιμία (60).

Το γεγονός ότι, τόσο το μόριο της ινσουλίνης, όσο και ο υποδοχέας της, δεν εμφανίζουν δομικές ανωμαλίες στο ΣΠΩ, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, οφείλεται σε βλάβη του μηχανισμού μετάδοσης του ινσουλινικού σήματος, μετά την σύνδεση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της (73,74). Αυτή η διαταραχή της αγωγής του σήματος της ινσουλίνης, αφορά μόνο στις δράσεις της ινσουλίνης που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και τίθεται επομένως ζήτημα εκλεκτικής αντίστασης στην ινσουλίνη (75).

Ένας πιθανός μηχανισμός εξήγησης της αντίστασης στην ινσουλίνη, τουλάχιστον στο 50% των γυναικών με ΣΠΩ, είναι η αυξημένη φωσφορυλίωση της σερίνης, αντί της τυροσίνης, του ινσουλινικού υποδοχέα. Κάποιος παράγοντας εξωγενής του ινσουλινικού υποδοχέα, πιθανότατα κάποια σερίνη/θρεονίνη κινάση) είναι υπεύθυνη για αυτή την φωσφορυλίωση της σερίνης, που οδηγεί σε διακοπή της μεταβίβασης του σήματος της ινσουλίνης (εικόνα 5) (76).



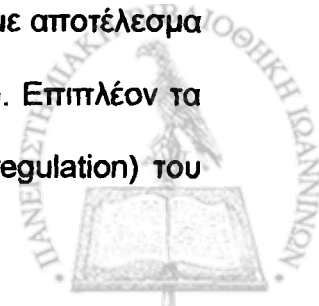
Εικόνα 5. Μηχανισμός αντίστασης στην ινσουλίνη στο ΣΠΩ. Κάποιος εξωγενής παράγοντας είναι υπεύθυνος για τη φωσφορυλίωση της σερίνης του ινσουλινικού υποδοχέα που διαταράσσει την αγωγή του σήματος της ινσουλίνης. Κυτταροκίνες και ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) ενεργοποιούν ενδοκυττάριας κινάσες και ίσως εμπλέκονται στη παθογένεια του ΣΠΩ.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση ότι ο μηχανισμός της φωσφορυλίωσης της σερίνης εμπλέκεται και στη ρύθμιση της δραστηριότητας της 17,20-λυάσης επηρεάζοντας την έκκριση των ανδρογόνων (77). Αυτή η διαπίστωση οδήγησε στην υπόθεση ότι ίσως να υπάρχει κοινή αιτιολογία για την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και υπερανδρογοναμίας στο ΣΠΩ.

Πλήθος συζητήσεων έχουν γίνει, όσον αφορά το δίλημμα, εάν η υπερανδρογοναιμία προκαλεί υπερινσουλιναιμία ή το αντίστροφο. Οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η υπερινσουλιναιμία οδηγεί σε υπερανδρογοναιμία. Έτσι η θεραπεία με αντιανδρογόνα, ή με φάρμακα που καταστέλλουν την ωθηκική στεροειδογένεση (GnRH αγωνιστές), ενώ μειώνει τα επίπεδα των ανδρογόνων, δεν βελτιώνει την υπερινσουλιναιμία (78-80). Επίσης, ελάττωση των επιπέδων της ινσουλίνης με φάρμακα που ευαισθητοποιούν τους περιφερικούς ιστούς στη δράση της ορμόνης ή αναστέλλουν την έκκρισή της, βελτιώνουν τα επίπεδα του ελεύθερου κλάσματος ανδρογόνων και την ωθηκική λειτουργία (81,82). Μολονότι υπάρχουν κάποιες μελέτες όπου η αντίσταση στην ινσουλίνη βελτιώθηκε με τη χορήγηση αντιανδρογόνων, η υπερανδρογοναιμία δε φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της αντίστασης στην ινσουλίνη στο ΣΠΩ (83,84).

Έχει βρεθεί, ότι τα υψηλά επίπεδα ινσουλίνης:

- διεγείρουν άμεσα την έκκριση της LH και αυξάνουν την ευαισθησία των υποφυσιακών κυττάρων που εκκρίνουν LH στην GnRH (85,86).
- διεγείρουν την παραγωγή ανδρογόνων από τα επινεφρίδια και τις ωθήκες ασκώντας ευοδωτική επίδραση στο κυτόχρωμα P450c17 (87,88),
- μειώνουν τα επίπεδα της SHBG με επακόλουθη αύξηση του ελεύθερου κλάσματος ανδρογόνων (89),
- μειώνουν τα επίπεδα της IGFBP-1 στο ήπαρ και την ωθήκη με αποτέλεσμα αύξηση των ελεύθερων IGFs στην κυκλοφορία και ενδοωθηκικά (90). Επιπλέον τα υψηλά επίπεδα ινσουλίνης προκαλούν προς τα πάνω ρύθμιση (upregulation) του



υποδοχέα του IGF-1, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η δράση των IGFs αλλά και της ινσουλίνης στην ωοθήκη (91) και,

- δρουν συνεργικά με την LH στο επίπεδο της ωοθήκης συμβάλλοντας στην ανωοθυλακιορρηξία και το σχηματισμό κύστεων (92).

Οι τρεις αυτές υποθέσεις, η κεντρική, η περιφερική (ωοθηκική και επινεφριδική) και της ινσουλίνης, είναι συνδεδεμένες και όχι απαραίτητα αλληλοαναιρούμενες. Παραδοσιακά το ΣΠΩ θεωρείται το αποτέλεσμα ενός «φαύλου κύκλου» που συμμετέχουν όλοι οι προηγούμενοι μηχανισμοί και σαν τελικό αποτέλεσμα έχουν την χρόνια ανωοθυλακιορρηξία και την υπερανδρογοναιμία.

Πρόσφατα διατυπώθηκε η θεωρία «των δύο χτυπημάτων» (two-hit hypothesis) σύμφωνα με την οποία χρειάζονται δύο ή περισσότερες διαταραχές για να εκδηλωθεί το σύνδρομο (34). Το πρώτο «χτύπημα» που προδιαθέτει στην εμφάνιση του ΣΠΩ είναι η διαταραχή των στεροειδικών ενζύμων που εμπλέκονται στην ωοθηκική και επινεφριδική παραγωγή ανδρογόνων και το δεύτερο «χτύπημα» αφορά διαταραχές που οδηγούν σε ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και υπερινσουλιναιμίας που επιδεινώνουν την υπερανδρογοναιμία.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι και η «εξελικτική θεωρία» (developmental origin hypothesis) σύμφωνα με την οποία ο φαινότυπος του ΣΠΩ είναι αποτέλεσμα γενετικά καθορισμένη έκθεσης σε αυξημένα ανδρογόνα κατά την ενδομήτρια ζωή. Αυτή η έκθεση στα ανδρογόνα, «προγραμματίζει» τον υποθαλαμικο-υποφυσιακό άξονα να αυξήσει την έκκριση της LH στην μετέπειτα ζωή και επίσης ευνοεί την ανάπτυξη κοιλιακής παχυσαρκίας προδιαθέτοντας στην εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη (93). Επομένως το ΣΠΩ μπορεί να αποδειχθεί σημαντικό μοντέλο μελέτης για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που συνεργικά συμβάλλουν στις ενδοκρινικές και μεταβολικές διαταραχές που το χαρακτηρίζουν.



3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΣΠΩ

Μολονότι υπάρχουν διαταραχές της ωθηκικής λειτουργίας που είναι γενετικά καθορισμένες, η συχνότητα αυτών των διαταραχών είναι σπάνια. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η πρόωρη ωθηκική ανεπάρκεια και η υποθαλαμική ανεπάρκεια της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (94,95). Κύριες γενετικές αιτίες, για την πλειοψηφία των περιπτώσεων ωθηκικής ανεπάρκειας, είναι οι χρωματοσωμικές ανωμαλίες όπως συμβαίνει για παράδειγμα στο σύνδρομο Turner και στη XO γοναδική δυσγενεσία. Αλλά η συχνότητα αυτών των νοσημάτων είναι μικρότερη από 0,02% (95). Το ΣΠΩ, σε αντίθεση, αποτελεί μια γενετικώς καθορισμένη διαταραχή της ωθηκικής λειτουργίας, που όμως είναι και αρκετά συχνή.

Κλινικές μελέτες των τελευταίων είκοσι χρόνων έδειξαν ότι το ΣΠΩ είναι μια οικογενής διαταραχή και διάφορα χαρακτηριστικά του συνδρόμου πιθανότατα κληρονομούνται με διαφορετικό τρόπο (96). Έχει βρεθεί ότι το 40% από τις αδερφές και το 20% από τις μητέρες γυναικών με ΣΠΩ, πληρούν τα κριτήρια του συνδρόμου και επιπλέον ποσοστό περίπου 10% από τις αδερφές και 13% από τις μητέρες έχουν είτε μόνο υπερτρίχωση είτε μόνο ολιγομηνόρροια (97). Επίσης, οι άντρες συγγενείς πρώτου βαθμού γυναικών με ΣΠΩ έχουν διαταραχή της έκκρισης των ανδρογόνων με αυξημένα επίπεδα DHEAS όπως συμβαίνει και στο 50% των γυναικών που έχουν συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενείς με ΣΠΩ (98,99). Από όλα τα χαρακτηριστικά του συνδρόμου, η υπερανδρογοναιμία per se αποτελεί το ισχυρότερο γενετικά κληρονομούμενο χαρακτηριστικό στις οικογένειες με μέλη που έχουν ΣΠΩ (100).

Ο καθορισμός του τύπου της κληρονομικότητας του συνδρόμου είναι δύσκολος, λόγω της ετερογένειας των κλινικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών του ΣΠΩ και γιατί όλες οι μελέτες που έχουν γίνει δεν έχουν χρησιμοποιήσει τα ίδια κριτήρια καθορισμού του συνδρόμου. Επιπλέον δεν υπάρχει σαφώς καθορισμένος ανδρικός φαινότυπος και αυτή η διαταραχή εκφράζεται κλινικά μόνο σε γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας.



Θεωρώντας ως αντρικό φαινότυπο του συνδρόμου την πρώιμη αλωπεκία (εμφάνιση αλωπεκίας πριν την ηλικία των 30) προτάθηκε ο αυτοσωματικός κυρίαρχος τύπος κληρονομικότητας με τον οποίο συμφωνούν και οι περισσότερες μελέτες (101-103). Υπάρχουν όμως και μελέτες που υποστηρίζουν, ότι η συχνότητα του ΣΠΩ σε κάποιες οικογένειες είναι τόσο μεγάλη και οι εκδηλώσεις τόσο ετερογενείς, ώστε δε μπορεί ο τύπος κληρονομικότητας να εξηγηθεί απλώς με τον αυτοσωματικό κυρίαρχο τύπο κληρονομικότητας του Mendel (104). Σε αυτό το συμπέρασμα συγκλίνει και μελέτη μονοζυγωτικών και διζυγωτικών διδύμων κοριτσιών σύμφωνα με την οποία το ΣΠΩ δεν μπορεί να είναι αποτέλεσμα μιας μόνο αυτοσωματικής βλάβης και ίσως να είναι το αποτέλεσμα πολυγονιδιακής επίδρασης (105).

Έτσι ο τύπος κληρονομικότητας παραμένει ασαφής, αν και γενικώς, θεωρείται ότι το ΣΠΩ αποτελεί επικρατούσα κληρονομική διαταραχή με υψηλό βαθμό εκφραστικότητας του φαινοτύπου και φαίνεται ότι περισσότερα από ένα γονίδια αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους αλλά και με περιβαλλοντικούς παράγοντες, κυρίως διατροφικούς, παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του συνδρόμου.

Οι περισσότερες μελέτες, που προσπάθησαν να εξηγήσουν τη γενετική βάση του συνδρόμου, είναι μελέτες συσχέτισης και μη-παραμετρικές αναλύσεις της γενετικής σύνδεσης και εστίασαν στη διερεύνηση γονιδίων που σύμφωνα με την παθοφυσιολογία του ΣΠΩ θεωρήθηκαν υποψήφια. Ως αποτέλεσμα ένα πλήθος γονιδίων έχει μελετηθεί στη προσπάθεια να εξηγηθεί η γενετική βάση του ΣΠΩ, που όμως παραμένει άγνωστη. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1, τα γονίδια που μελετήθηκαν μπορούν να ομαδοποιηθούν σε πέντε κατηγορίες:

- γονίδια που εμπλέκονται στην έκκριση και δράση των γοναδοτροπινών,
- γονίδια που εμπλέκονται στην σύνθεση και δράση των ανδρογόνων,
- γονίδια που εμπλέκονται στην έκκριση και δράση της ινσουλίνης
- γονίδια που εμπλέκονται στην ωοθυλακιογένεση και,
- γονίδια που σχετίζονται με την παχυσαρκία και την ενεργειακή ομοιόσταση.

Τα σημαντικότερα από αυτά τα γονίδια αναφέρονται στη συνέχεια.



A. Γονίδια που εμπλέκονται στην έκκριση και δράση των γοναδοτροπινών

1. Γονίδιο του υποδοχέα της GnRH
2. Γονίδιο της β-υποομάδας της LH (LH-β).
3. Γονίδιο του υποδοχέα της LH
4. Γονίδιο της β-υποομάδας της FSH (FSH-β)
5. Γονίδιο του υποδοχέα της FSH.
6. Γονίδια των D2 και D3 ντοπαμινεργικών υποδοχέων

B. Γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση και δράση των ανδρογόνων

1. Γονίδιο της οξείας στεροειδογενετικής ρυθμιστικής πρωτεΐνης (StAR)
2. Γονίδιο CYP17
3. Γονίδιο CYP11a
4. Γονίδιο CYP19
5. Γονίδιο CYP21
6. Γονίδιο της 3β-HSD I, II
7. Γονίδιο της 11β-HSD I, II, III
8. Γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων

Γ. Γονίδια που εμπλέκονται στην έκκριση και δράση της ινσουλίνης

1. Γονίδιο της ινσουλίνης
2. Γονίδιο του υποδοχέα της ινσουλίνης
3. Γονίδια των υποστρωμάτων του ινσουλινικού υποδοχέα -1 και -2
4. Γονίδιο της PC-1
5. Γονίδιο της πρωτεϊνικής τυροσινικής φωσφατάσης 1B (PTP1B)
6. Γονίδιο του IGF-1, IGF-2 και των υποδοχέων τους
7. Γονίδιο της IGFBP1+3
8. Γονίδιο του PPARγ
9. Γονίδιο της καλπαΐνης10
10. Γονίδιο της παραοξονάσης

Δ. Γονίδια που εμπλέκονται στην ωοθυλακιογένεση

1. Γονίδιο της φολλιστατίνης
2. Γονίδιο του υποδοχέα της ακτιβίνης 1 και 2A και 2B.

E. Γονίδια που εμπλέκονται στην παχυσαρκία / ενεργειακή ομοιόσταση

1. Γονίδιο της λεπτίνης και του υποδοχέα της λεπτίνης
2. Γονίδιο του γλυκοκορτικοειδικού υποδοχέα

Πίνακας 1. Γονίδια που έχουν μελετηθεί για τη πιθανή συσχέτισή τους με το ΣΠΩ (130,190-192)



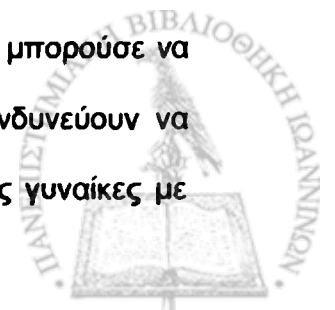
3.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ

3.1.1. Γονίδιο της β-υποομάδας της ωχρινोटρόπου ορμόνης (LH-β).

Βασιζόμενοι στην παρατήρηση ότι στο ΣΠΩ υπάρχει υπερέκκριση της LH, το γονίδιο της β-υποομάδας της LH (LH-β) θεωρήθηκε ένα από τα υποψήφια γονίδια. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο γενετικές παραλλαγές της LH. Η πρώτη γενετική παραλλαγή (vLH), φέρει δύο σημειακές μεταλλάξεις στο εξόνιο 2, και συγκεκριμένα φέρει αλλαγή της Trp (TGG) σε Arg (CGG) στη θέση 8 και της Ile (ATC) σε Thr (ACC) στη θέση 15, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα δομικές αλλαγές του μορίου της LH (106).

Αυτή η γενετική παραλλαγή αποτελεί έναν παγκοσμίως κοινό πολυμορφισμό με μέση συχνότητα εμφάνισης που φθάνει στο 18,5% του πληθυσμού. Παρατηρείται σε μεγαλύτερη συχνότητα σε πληθυσμούς της βόρειας Ευρώπης (41.9% στους Λάπωνες της βόρειας Φινλανδίας) και η συχνότητα μειώνεται καθώς αυξάνει η γεωγραφική απόσταση, έχοντας τη μικρότερη συχνότητα εμφάνισης σε πληθυσμούς της Ασίας (12% στην Ιαπωνία, 7.1% στους Ιθαγενείς Μεξικανούς που είναι ασιατικής προέλευσης) (107). Όσον αφορά τη λειτουργική σημασία αυτής της παραλλαγής, έχει βρεθεί ότι ενώ σε *in vitro* πειράματα είναι πιο βιολογικά δραστική από τον άγριο τύπο LH, ο χρόνος ημιζωής της vLH στην κυκλοφορία είναι μικρότερος και έτσι το συνολικό αποτέλεσμα, όσον αφορά την *in vivo* δράση της, παραμένει ασαφές (108).

Από τη στιγμή που περιγράφηκε η vLH, αυξημένο ενδιαφέρον δόθηκε στη πιθανή συσχέτιση με καταστάσεις ωθητικής δυσλειτουργίας και οι πρώτες μελέτες έδειξαν να συσχετίζεται με υπογονιμότητα (106,109). Οι Tapanainen et al (110) διαπίστωσαν ότι αυτή η γενετική παραλλαγή παρατηρείται σε μικρότερη συχνότητα σε παχύσαρκες ασθενείς με ΣΠΩ και έτσι φαίνεται ότι ίσως η vLH κατά κάποιο τρόπο προστατεύει τις παχύσαρκες γυναίκες από το να αναπτύξουν ΣΠΩ και πιθανότατα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση παχύσαρκων γυναικών που κινδυνεύουν να αναπτύξουν ΣΠΩ. Ωστόσο δεν παρατήρησαν διαφορές ανάμεσα στις γυναίκες με



ΣΠΩ όταν τις συνέκριναν συνολικά με υγιείς γυναίκες, συμπεραίνοντας ότι ο πολυμορφισμός αυτός δεν σχετίζεται με την ανάπτυξη του συνδρόμου, κάτι που επιβεβαιώθηκε και σε άλλες μελέτες (107, 111-113). Επιπλέον, το γεγονός ότι η νLH παρατηρείται σε μεγάλη συχνότητα, τόσο σε υγιείς γυναίκες όσο και σε γυναίκες με ΣΠΩ, δείχνει ότι η νLH είναι συμβατή με τη γονιμότητα.

Η δεύτερη γενετική παραλλαγή της LH, αφορά σε μια σημειακή αλλαγή στο εξόνιο 3 του LH-β γονιδίου, που οδηγεί σε αντικατάσταση της γλυκίνης από σερίνη στη θέση 102 (114). Οι αρχικές μελέτες συσχέτισαν αυτή την παραλλαγή με την ανάπτυξη υπογονιμότητας στις γυναίκες (112,115). Η λειτουργική σημασία της όμως δεν έχει καθοριστεί και υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με το αν αυτός ο πολυμορφισμός επηρεάζει τη βιοδραστικότητα της LH (116,117) και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να καθοριστεί η φυσιολογική σημασία αυτής της παραλλαγής καθώς και ο πιθανός ρόλος στην παθογένεια του ΣΠΩ.

3.2. ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ

3.2.1 Το γονίδιο της 17α-υδροξυλάσης / 17,20-λυάσης (CYP 17)

Οι γυναίκες με ΣΠΩ εμφανίζουν διαταραχή της λειτουργίας του κυτοχρώματος P450c17a (εικόνα 4) και πιο συγκεκριμένα έχουν αυξημένη δραστηριότητα της 17α-υδροξυλάσης και σε μικρότερο βαθμό της 17,20-λυάσης (118). Η σχετική αναλογία της δραστηριότητας της 17-υδροξυλάσης προς την 17,20-λυάση αποτελεί το κλειδί ελέγχου για τη βιοσύνθεση των ανδρογόνων και επομένως διαταραχή αυτού του λόγου θα μπορούσε να οδηγήσει σε διαταραχή της έκκρισης των ανδρογόνων από τις ωοθήκες και τα επινεφρίδια.

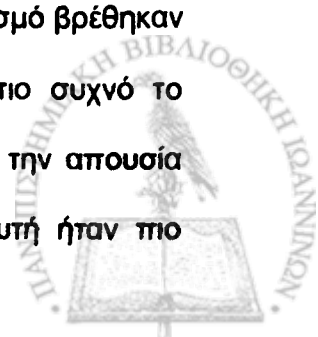
Αποτέλεσμα αυτών των παρατηρήσεων ήταν να μελετηθεί ο πιθανός ρόλος του CYP17, που είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το κυτόχρωμα P450c17a και βρίσκεται στο χρωματόσωμα 10q24.3 (119). Έχει βρεθεί ότι το γονίδιο αυτό υπερεκφράζεται στα κύτταρα θήκης των πολυκυστικών ωοθηκών (120). Στη ρυθμιστική περιοχή του

CYP17 γονιδίου, έχει περιγραφεί μια σημειακή αλλαγή βάσης (θυμίνη σε κυτοσίνη), 34 ζεύγη βάσεων πριν το σημείο έναρξης της μετάφρασης, στην περιοχή του υποκινητή (promoter). Λόγω της θέσης αυτού του πολυμορφισμού πιθανολογήθηκε ότι θα μπορούσε να ευθύνεται για την υπερέκφραση του γονιδίου CYP17 οδηγώντας σε αυξημένη σύνθεση ανδρογόνων. Οι αρχικές μελέτες υποστήριξαν ότι υπάρχει συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού και συγκεκριμένα του σπάνιου αλληλόμορφου με το ΣΠΩ, αλλά αφορούσαν μικρό πληθυσμό ατόμων (121,122). Μετέπειτα πολυπληθέστερες μελέτες έδειξαν ότι η συχνότητα του δεν διέφερε στις γυναίκες με ΣΠΩ σε σύγκριση με υγιείς γυναίκες και δεν βρέθηκε συσχέτισμός του με τα επίπεδα τεστοστερόνης (123-125). Επιπλέον, βρέθηκε ότι αυτός ο πολυμορφισμός δεν έχει λειτουργική σημασία για την έκφραση του CYP17 (126). Φαίνεται επομένως ότι αυτή η αλλαγή βάσης στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου CYP17 αποτελεί συνήθη πολυμορφισμό και πιθανότατα άλλοι μηχανισμοί να ευθύνονται για την υπερέκφραση του γονιδίου CYP17 στο ΣΠΩ (127).

3.2.2. Το γονίδιο αποκοπής πλάγιας αλύσου χοληστερόλης (CYP11a).

Εκτός από το γονίδιο CYP17 και το γονίδιο CYP11a, που κωδικοποιεί το ένζυμο αποκοπής της πλάγιας αλύσου χοληστερόλης (P450_{sc}, P450 side chain cleavage enzyme) έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στα κύτταρα θήκης και κοκκιώδη κύτταρα της ωθήκης στο ΣΠΩ (120). Έτσι το γονίδιο CYP11a μελετήθηκε για πιθανούς πολυμορφισμούς που θα μπορούσαν να συσχετιστούν με το ΣΠΩ.

Το γονίδιο CYP11a βρίσκεται στο μακρό βραχίονα του χρωμοσώματος 15, στη θέση 15q24 (119). Στην περιοχή του υποκινητή, ταυτοποιήθηκε μια πολυμορφική περιοχή και πιο συγκεκριμένα μια πεντανουκλεοτιδική επανάληψη (TTTTA)_n, -528bps από το ATG σημείο έναρξης της μετάφρασης. Στον φυσιολογικό πληθυσμό βρέθηκαν αλληλόμορφα με τέσσερις, έξι, οκτώ και εννέα επαναλήψεις, με πιο συχνό το αλληλόμορφο με τις τέσσερις επαναλήψεις. Το ΣΠΩ συσχετίστηκε με την απουσία του αλληλόμορφου με τις τέσσερις επαναλήψεις και η συσχέτιση αυτή ήταν πιο



σημαντική ιδιαίτερα σε ασθενείς με κλινικά σημεία υπερανδρογοναιμίας (128). Στην ίδια μελέτη ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε και με τα επίπεδα τεστοστερόνης ορού (128). Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια και σε ελληνικό πληθυσμό γυναικών με ΣΠΩ (129).

Αν και αρχικά, το γονίδιο CYP11a θεωρήθηκε ως κύριος γενετικός τόπος (locus) για την εμφάνιση του ΣΠΩ, υπήρξαν μελέτες που δεν επιβεβαίωσαν τη συσχέτιση του (ttta)_n πολυμορφισμού με την ανάπτυξη του συνδρόμου και τα διαφορετικά αποτελέσματα αποδόθηκαν σε φυλετικές ή εθνικές διαφορές των πληθυσμών μελέτης (130-132). Επιπλέον βρέθηκε ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου CYP11a και επομένως δεν μπορεί να εξηγήσει την υπερέκφραση του γονιδίου στο ΣΠΩ (126). Έτσι φαίνεται ότι η συμβολή του στη παθογένεια του συνδρόμου είναι μικρή, ενώ δεν είναι απίθανο άλλοι πολυμορφισμοί του CYP11a να εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ΣΠΩ.

3.2.3. Το γονίδιο της αρωματάσης (CYP19)

Ένα άλλο ένζυμο κλειδί για τη στεροειδογένεση είναι η αρωματάση (P450arom), που καταλύει την μετατροπή των C19 στεροειδών (ανδρογόνα) σε C18 (οιστρογόνα) (133). Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ασθενών με υπερανδρογοναιμία που οφειλόταν σε έλλειψη αρωματάσης (134,135). Επιπλέον, σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες πολυκυστικών ωθηκών, δεν μπόρεσε να ανιχνευθεί επαρκή ποσότητα αρωματάσης, σε θυλάκια διαφόρων μεγεθών (136). Ως αποτέλεσμα αυτών των παρατηρήσεων, εξετάστηκε ο πιθανός ρόλος του γονιδίου της αρωματάσης (CYP19) στο ΣΠΩ, αλλά ως τώρα μελέτες του γονιδίου δεν το συσχετίζουν με το σύνδρομο (128,130,137). Επιπρόσθετα σε *in vitro* μελέτες κοκκιωδών κυττάρων πολυκυστικών ωθηκών παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή οιστραδιόλης μετά από διέγερση με FSH, σε σύγκριση με κύτταρα φυσιολογικών ωθηκών και αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχουν στοιχεία για πραγματική έλλειψη αρωματάσης στις πολυκυστικές ωθήκες (138). Επομένως δεν υπάρχουν στοιχεία

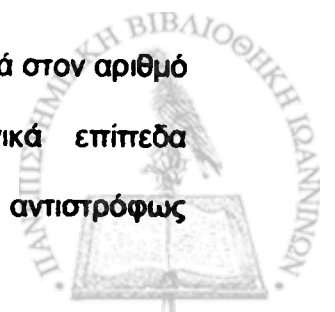
που να τεκμηριώνουν της αρχική υπόθεση για τον πιθανό ρόλο της αρωματάσης στο ΣΠΩ.

3.2.4. Το γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR)

Όλα τα ανδρογόνα δρουν μέσω του υποδοχέα των ανδρογόνων, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων και κωδικοποιείται από το γονίδιο AR, που έχει χαρτογραφηθεί στη θέση Χq11-12 (139,140). Το γονίδιο AR περιέχει μια πολυμορφική περιοχή στο εξόνιο 1, η οποία αποτελείται από επαναλαμβανόμενα CAG τρινουκλεοτίδια που κωδικοποιεί μια πολυγλουταμινική αλυσίδα στην αμινοτελική λειτουργική περιοχή του υποδοχέα (141). Σε υγιή άτομα, ο αριθμός των επαναλήψεων CAG ποικίλλει από 11 έως 31, με πιο συχνό αλληλόμορφο, το αλληλόμορφο με τις 20 επαναλήψεις (142).

Το μήκος αυτής της πολυμορφικής περιοχής συσχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την μεταφραστική δραστηριότητα του γονιδίου AR. Πιο συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των επαναλήψεων, τόσο μικρότερη είναι η μεταφραστική δραστηριότητα του γονιδίου (143). Είναι γνωστό ότι αλληλουχίες επαναλαμβανόμενων τρινουκλεοτιδίων αποτελούν θέσεις γενετικής αστάθειας και μπορεί να είναι υπεύθυνες για πρόκληση γενετικών νοσημάτων, όπως είναι το σύνδρομο του εύθραυστου Χ και η μυτοκινική δυστροφία (144). Στην περίπτωση του γονιδίου AR, έχει βρεθεί ότι παθολογικά μεγάλος αριθμός CAG επαναλήψεων (>40), προκαλεί το σύνδρομο Kennedy, ένα φυλοσύνδετο σύνδρομο, το οποίο χαρακτηρίζεται από προοδευτική νωτιαία μυϊκή ατροφία και ποικίλου βαθμού αντίσταση στα ανδρογόνα (145). Ενώ, σχετικά μικρός αριθμός CAG επαναλήψεων (<22) σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη και μικρότερο κίνδυνο υπογονιμότητας στους άντρες (146,147).

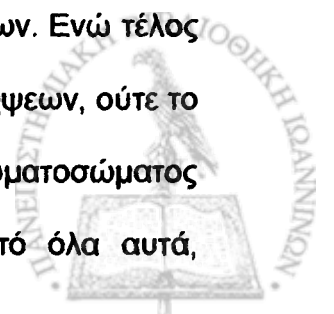
Όσον αφορά το ΣΠΩ, οι Legro et al (148), μολονότι δεν βρήκαν διαφορά στον αριθμό των CAG επαναλήψεων συγκρίνοντας γυναίκες με φυσιολογικά επίπεδα ανδρογόνων και υπερανδρογοναιμικές γυναίκες, παρατήρησαν μια αντιστρόφως



ανάλογη σχέση του αριθμού των επαναλήψεων με το βαθμό υπερτρίχωσης σε γυναίκες με ιδιοπαθή υπερτρίχωση. Κατέληξαν, έτσι, στη διαπίστωση ότι οι υποδοχείς ανδρογόνων με βραχεία CAG αλληλόμορφα είχαν αυξημένη ευαισθησία στα ανδρογόνα. Άλλη κλινική παρατήρηση που υποστηρίζει αυτή τη διαπίστωση, δόθηκε με τη συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού με ανδρογενετικές δερματικές εκδηλώσεις, τόσο σε γυναίκες όσο και σε άντρες (149). Επίσης, οι Mifsud et al (150) παρατήρησαν αυξημένη συχνότητα βραχέων CAG αλληλομόρφων στην υποομάδα γυναικών με ΣΠΩ που είχαν χαμηλά επίπεδα ανδρογόνων, αποδίδοντας τον φαινότυπο ΣΠΩ αυτής της υποομάδας, σε αυξημένη ενδογενή δραστηριότητα του υποδοχέα των ανδρογόνων, λόγω των βραχέων CAG αλληλομόρφων.

Οι Vottero et al (151) δεν παρατήρησαν διαφορά στη συχνότητα αυτού του πολυμορφισμού σε γυναίκες με υπερανδρογοναιμία και σε υγιείς γυναίκες και υποστήριξαν τη θεωρία της παράκαμψης της τυχαίας απενεργοποίησης του X χρωματοσώματος. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, σε αντίθεση με την υπόθεση του Lyon που υποστηρίζει τη τυχαία μεθυλίωση του ενός από τα X χρωματοσώματα, στις γυναίκες με υπερτρίχωση μεθυλιώνεται κατά προτίμηση το μεγαλύτερο σε μήκος αλληλόμορφο του γονιδίου AR. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το μεθυλιωμένο αλληλόμορφο να μη μπορεί να εκφραστεί και να επιτρέπει στο βραχύτερο αλληλόμορφο να είναι λειτουργικό και υπεύθυνο για την περιφερική υπερευαισθησία στη δράση των ανδρογόνων.

Σε αντίθεση, οι Hickey et al (152) επιβεβαίωσαν ότι το μεγαλύτερο σε μήκος CAG αλληλόμορφο είναι αυτό που μεθυλιώνεται, χωρίς όμως αυτό να αποτελεί χαρακτηριστικό των γυναικών με ΣΠΩ και επίσης παρατήρησαν ότι στο ΣΠΩ παρατηρούνται σε μεγαλύτερη συχνότητα μακρά CAG αλληλόμορφα (>22 επαναλήψεις) που συσχετίζονται και με υψηλότερα επίπεδα ανδρογόνων. Ενώ τέλος οι Calvo et al (153), διαπίστωσαν ότι ούτε ο αριθμός των CAG επαναλήψεων, ούτε το φαινόμενο της παράκαμψης της τυχαίας απενεργοποίησης του X χρωματοσώματος σχετίζονται με την ύπαρξη υπερανδρογοναιμίας στις γυναίκες. Από όλα αυτά,



φαίνεται ότι χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να διερευνηθεί ο ρόλος αυτού του πολυμορφισμού στην ανάπτυξη του ΣΠΩ.

3.3. ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ.

3.3.1. Το γονίδιο της ινσουλίνης

Η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι κατά μεγάλο βαθμό αναστρέψιμη με την ελάττωση του σωματικού βάρους σε παχύσαρκες ασθενείς με ΣΠΩ, ωστόσο εξακολουθεί να υπάρχει διαταραχή της πρώτης φάσης της έκκρισης της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος (154). Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου της ινσουλίνης στην παθογένεια του ΣΠΩ.

Το γονίδιο της ινσουλίνης βρίσκεται ανάμεσα από το γονίδιο της υδροξυλάσης της τυροσίνης και το γονίδιο του παρόμοιου με την ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα-2 (IGF-2), στο χρωμόσωμα 11p15.5 (155). Σε αυτό το γονίδιο, στο 5' άκρο, μελετήθηκε μια μικροδορυφορική περιοχή, αποτελούμενη από ποικίλο αριθμό επαναλήψεων, το INS-VNTR (Insulin Gene Variable Number Tandem Repeats). Αυτή η περιοχή φαίνεται να εμπλέκεται άμεσα στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της ινσουλίνης. Πρόκειται για μια πολυμορφική περιοχή, η οποία αποτελείται από αλληλουχίες 14-15 ζευγών βάσεων που επαναλαμβάνονται. Η πιο συχνή επαναλαμβανόμενη αλληλουχία είναι η ACAGGGGTGTGGGG. Ο πολυμορφισμός INS-VNTR βρίσκεται 596 ζεύγη βάσεων πριν το κωδικόνιο έναρξης (ATG) της μετάφρασης του γονιδίου της ινσουλίνης, στην περιοχή του υποκινητή.

Ο αριθμός των επαναλήψεων στην μικροδορυφορική αυτή περιοχή του γονιδίου ποικίλλει από 26 έως και πάνω από 200. Τα αλληλόμορφα του INS-VNTR διακρίνονται σε τρεις τύπους ανάλογα με το μέγεθος:

- τα τύπου I αλληλόμορφα (class I) είναι τα βραχύτερα και αποτελούνται από 26-63 επαναλήψεις (κατά μέσο όρο 40 επαναλήψεις),

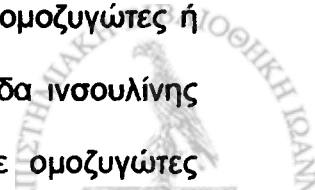


- τα τύπου II (class II) αλληλόμορφα είναι σπάνια στην Καυκάσια φυλή, έχουν μέτριο μέγεθος, αποτελούμενα από περίπου 80 επαναλήψεις, και
- τα τύπου III (class III) αλληλόμορφα, που έχουν το μεγαλύτερο μέγεθος, έχοντας 141-209 επαναλήψεις (κατά μέσο όρο 157 επαναλήψεις) (156).

Ο πολυμορφισμός INS-VNTR έχει λειτουργική σημασία, ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της ινσουλίνης και πιθανότατα και του γονιδίου του IGF-2 (157). Δεν κωδικοποιεί καμία γνωστή πρωτεΐνη και έχει βρεθεί ότι το γονίδιο της ινσουλίνης, που περιέχει το τύπου III INS-VNTR αλληλόμορφο, έχει μεγαλύτερη μεταγραφική δραστηριότητα από το τύπου I INS-VNTR αλληλόμορφο (158). Ο λειτουργικός ρόλος του πολυμορφισμού πιθανότατα επιτυγχάνεται μέσω σύνδεσης με μεταγραφικούς παράγοντες, όπως φάνηκε σε *in vitro* πειράματα. Πιο συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός INS-VNTR περιέχει θέσεις υψηλής συγγένειας σύνδεσης με τον μεταγραφικό παράγοντα Puf-1, που έχει την ικανότητα να επάγει την έκφραση του γονιδίου της ινσουλίνης, ακόμα και σε κύτταρα που υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν εκφράζουν το γονίδιο της ινσουλίνης (158).

Το τύπου III αλληλόμορφο του INS-VNTR, και ειδικότερα ο γονότυπος III/III, έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (159-161). Επίσης, αυτός ο γονότυπος έχει συσχετιστεί με την κεντρική παχυσαρκία (159) και με μεγαλύτερο βάρος γέννησης (161). Επιπλέον το επίτοπο (locus) IDDM2 του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 έχει χαρτογραφηθεί στο INS-VNTR και το τύπου III αλληλόμορφο έχουν συσχετιστεί με μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (162).

Οι Waterworth et al (163) παρατήρησαν ότι τα τύπου III αλληλόμορφα και ιδιαίτερα ο γονότυπος III/III, σχετίζονται και με την ανάπτυξη του ΣΠΩ, ειδικότερα σε γυναίκες με ανωθυλακιωρηκτικούς κύκλους. Επίσης παρατήρησαν ότι γυναίκες ομοζυγώτες ή ετεροζυγώτες για το τύπου III αλληλόμορφο είχαν υψηλότερα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας και μεγαλύτερο δείκτη μάζας σώματος, συγκρινόμενες με ομοζυγώτες γυναίκες για το τύπου I αλληλόμορφο. Αυτό το συμπέρασμα επιβεβαιώνεται και από



την παρατήρηση ότι οι γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες και χρόνια ανωθυλακιορρηξία έχουν σημαντικότερου βαθμού υπερινσουλιναμία από υπερανδρογοναιμικές ασθενείς με φυσιολογικό εμμηνορρυσιακό κύκλο (164). Επίσης στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι ο ομόζυγος γονότυπος III/III είναι συχνότερος σε γυναίκες με ΣΠΩ παρά σε γυναίκες που έχουν μόνο πολυκυστική εμφάνιση ωοθηκών και είναι ασυμπτωματικές (163). Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση, ότι το τύπου III αλληλόμορφο μεταβιβάζεται συχνότερα από το τύπου I αλληλόμορφο από I/III ετερόζυγους γονείς σε κορίτσια με ανωρρηκτικό ΣΠΩ και η μεταβίβαση αυτή είναι συχνότερη από τον πατέρα (165,166).

Η συσχέτιση του ΣΠΩ με τον πολυμορφισμό INS-VNTR επιβεβαιώθηκε και από τους Michelmore et al (167). Ωστόσο υπήρξαν και μελέτες που υποστήριξαν την έλλειψη συσχέτισης αυτού του πολυμορφισμού με το ΣΠΩ (130,168,169). Αυτές οι διαφορές πιθανότατα οφείλονται στα διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πληθυσμών αλλά και στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του πολυμορφισμού, μιας και υπήρξαν μελέτες με άμεση ταυτοποίηση του μήκους του INS-VNTR και άλλες όπου η ταυτοποίηση του πολυμορφισμού έγινε έμμεσα με τη χρήση σημειακού πολυμορφισμού που βρίσκεται σε σύνδεση με τον INS-VNTR.

Φαίνεται ότι ο πολυμορφισμός INS-VNTR είναι κύριος γενετικός τόπος για το ΣΠΩ. Αν λάβουμε υπόψη ότι τα τύπου III INS-VNTR αλληλόμορφα έχουν επίσης συσχετιστεί και με τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι αυτός ο γονότυπος μπορεί να προδιαθέσει, όχι μόνο στην εμφάνιση του ΣΠΩ, αλλά και να καθορίσει ποιες από αυτές τις γυναίκες αντιμετωπίζουν κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη στο μέλλον.

3.3.2 Το γονίδιο του υποδοχέα της ινσουλίνης

Ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι μια ετεροτετραμερής γλυκοπρωτεΐνη αποτελούμενη από δύο α- και δύο β- υποομάδες. Το γονίδιο, που κωδικοποιεί τον



υποδοχέα της ινσουλίνης αποτελείται από 22 εξόνια και βρίσκεται στο χρωματόσωμα 19 (170). Η αρχική υπόθεση ήταν, ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη, που χαρακτηρίζει το ΣΠΩ, θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα ανωμαλίας του υποδοχέα της ινσουλίνης. Εξάλλου μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα σπάνια σύνδρομα τα οποία, όπως και το ΣΠΩ, χαρακτηρίζονται από υπερανδρογοναιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη (λεπρεχωνισμός, σύνδρομο Rabson-Mendenhall, Τύπου Α αντίσταση) (171).

Μοριακές μελέτες του γονιδίου του υποδοχέα της ινσουλίνης σε γυναίκες με ΣΠΩ έδειξαν μεγάλο αριθμό «σιωπηλών» πολυμορφισμών, κυρίως στις αλληλουχίες των ιντρονίων (στο 5' ιντρόνιο του εξονίου 3, στα 3' ιντρόνια των εξονίων 6,7 και 15 και στα ιντρόνια του εξονίου 22). Αν και οι πολυμορφισμοί των ιντρονίων είναι μικρής λειτουργικής σημασίας, είναι πιθανό να μεταβάλλουν το συναρμογή (splicing) των εξονίων. Όμως, αυτοί οι πολυμορφισμοί ανιχνεύτηκαν και σε φυσιολογικά άτομα, αποτελούν συνήθεις μεταλλάξεις και δε μπορούν να οδηγήσουν σε αξιοσημείωτη διαταραχή της λειτουργίας του υποδοχέα (73,74,172). Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η λειτουργία του υποδοχέα της ινσουλίνης πιθανότατα είναι φυσιολογική σε γυναίκες με ΣΠΩ. Δεν έχει καθοριστεί ακόμη, αν υπάρχει γενετική βάση για την αυξημένη φωσφορυλίωση της σερίνης αντί της τυροσίνης στην β-υποομάδα του υποδοχέα της ινσουλίνης, που αναστέλλει την αγωγή του σήματος της ινσουλίνης μετά τη σύνδεση με τον υποδοχέα της (76).

Πρόσφατες μελέτες, έδειξαν συσχέτιση του ΣΠΩ με ένα γενετικό τόπο (locus), το D19S884, που βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 19 (19p13.3), κοντά, αλλά όχι σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium), με το γονίδιο του υποδοχέα της ινσουλίνης (137,173). Επομένως, είναι απίθανο η συσχέτιση αυτού του γενετικού τόπου με το ΣΠΩ, να οφείλεται σε σύνδεση του με κάποιο πολυμορφισμό του γονιδίου του υποδοχέα της ινσουλίνης και κάποιο άγνωστο γειτονικό γονίδιο φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο. Ωστόσο χρειάζονται περισσότερες και



πολυπληθέστερες μελέτες να επιβεβαιώσουν αν αυτός ο γενετικός τόπος έχει λειτουργική σημασία και επηρεάζει τη δράση της ινσουλίνης.

Το ίδιο χρειάζεται να συμβεί και για πρόσφατες μελέτες που συσχετίζουν πολυμορφισμούς των γονιδίων που κωδικοποιούν τα υποστρώματα-1 και -2 του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS-1, IRS-2) με μεταβολικές παραμέτρους του ΣΠΩ (174,175). Τα υποστρώματα IRS-1 και IRS-2 είναι βασικής σημασίας για την αγωγή του σήματος της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους και έχει βρεθεί ότι δύο πολυμορφισμοί των γονιδίων τους (ο Gly972Arg στο IRS-1 και ο Gly1057Asp στο IRS-2) συσχετίζονται με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (176). Ο πολυμορφισμός Gly972Arg έχει επίσης βρεθεί ότι επηρεάζει την έκκριση της ινσουλίνης από τα β-παγκρεατικά κύτταρα και την μεταφορά γλυκόζης στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα (177,178). Αυτοί οι πολυμορφισμοί μελετήθηκαν και στο ΣΠΩ και βρέθηκε να συσχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη αλλά όχι με το ΣΠΩ *per se* (174,175).

3.4 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΩΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

3.4.1 Το γονίδιο της φολλιστατίνης.

Μια πρόσφατη μελέτη (130) 37 υποψήφιων γονιδίων που εμπλέκονται στην αναπαραγωγή, στην έκκριση και δράση της ινσουλίνης και τον ενεργειακό μεταβολισμό, υπέδειξε πιθανή συσχέτιση του ΣΠΩ με το γονίδιο της φολλιστατίνης. Η φολλιστατίνη είναι πρωτεΐνη σύνδεσης της ακτιβίνης και έχει βρεθεί σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες ότι δρα εξουδετερώνοντας τη βιολογική δράση της ακτιβίνης (179). Τόσο η φολλιστατίνη όσο και η ακτιβίνη, εκφράζονται σε ποικίλους ιστούς, συμπεριλαμβανόμενου των ωοθηκών, της υπόφυσης, του φλοιού των επινεφριδίων και του παγκρέατος (180).

Η ακτιβίνη προάγει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, αναστέλλει την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης των ωοθηκών, αυξάνει την έκκριση της FSH από την υπόφυση καθώς και την έκκριση της ινσουλίνης από τα β-παγκρεατικά κύτταρα (180,181). Τα αποτελέσματα της δράσης της φολλιστατίνης, όπως είναι



αναμενόμενο, είναι αντίθετα από τη δράση της ακτιβίνης, και αυτό επιβεβαιώθηκε σε πειραματόζωα με αυξημένα επίπεδα φολλιστατίνης και τα οποία τελικά ανέπτυξαν χαρακτηριστικά ίδια με τα χαρακτηριστικά του ΣΠΩ (182).

Ωστόσο η μελέτη της αλληλουχίας του γονιδίου της φολλιστατίνης έδειξε ότι δεν υπάρχουν πολυμορφισμοί που συσχετίζονται με το ΣΠΩ. Πιο συγκεκριμένα οι Urbanek et al (183) ταυτοποίησαν 17 γενετικές παραλλαγές του γονιδίου από τις οποίες οι 16 είναι πολύ σπάνιες και η μόνη συνήθης γενετική παραλλαγή είναι μια σημειακή αντικατάσταση βάσης σε περιοχή που όμως δε μεταφράζεται (3' άκρο του γονιδίου). Άλλες δύο μελέτες δεν κατάφεραν να ταυτοποιήσουν πολυμορφισμούς που να συσχετίζονται με το ΣΠΩ καταλήγοντας στο ίδιο συμπέρασμα (184,185).

Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της φολλιστατίνης στις γυναίκες με ΣΠΩ κατέληξε σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι Fujiwara et al (186) δεν διαπίστωσαν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της φολλιστατίνης στα κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης, συγκρίνοντας γυναίκες με ΣΠΩ και υγιείς γυναίκες και ομοίως οι Erickson et al (187) δεν βρήκαν διαφορά στα επίπεδα της φολλιστατίνης στο θυλακικό υγρό συγκρίνοντας πολυκυστικές και φυσιολογικές ωοθήκες. Σε αντίθεση όμως, υπήρξαν μελέτες που παρατήρησαν ότι τα επίπεδα της φολλιστατίνης στο αίμα είναι υψηλότερα σε γυναίκες με ΣΠΩ (188,189). Από όλα αυτά φαίνεται ότι η συμβολή του γονιδίου της φολλιστατίνης στο ΣΠΩ, αν υπάρχει, είναι πολύ μικρή.



Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η συμβολή στην κατανόηση της γενετικής βάσης του ΣΠΩ, διερευνώντας τη πιθανή συσχέτιση πολυμορφισμών υποψηφίων γονιδίων με την ανάπτυξη του συνδρόμου και με μεταβολικές παραμέτρους που το χαρακτηρίζουν. Πρόκειται για μια μελέτη συσχέτισης, όπου έγινε σύγκριση γυναικών με ΣΠΩ με υγιείς γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Ως υποψήφια γονίδια, μελετήθηκαν το γονίδιο της ρεζιστίνης της αδιπονεκτίνης και της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης (SHBG).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αντίσταση στην ινσουλίνη αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά του ΣΠΩ παίζοντας σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του. Πολλές μελέτες προσπάθησαν να εξηγήσουν τους πιθανούς κυτταρικούς μηχανισμούς, που συμμετέχουν στην ανάπτυξη της αντίστασης στην ινσουλίνη, εστιάζοντας την προσοχή στο ρόλο του λιποκυττάρου. Ο λιπώδης ιστός απέκτησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον μετά την ανακάλυψη της λεπτίνης το 1994, που άλλαξε τη θεώρηση του από ένα απλό ιστό αποθήκευσης ενέργειας σε ενδοκρινικό εκκριτικό όργανο (193). Πιστεύεται ότι εκκρίνει ποικίλα πρωτεϊνικά μόρια (λιποκυτταροκίνες) με ενδοκρινικές λειτουργίες που επιτρέπουν στο λιποκύτταρο να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης και πιθανότατα συμβάλλουν στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη (194).

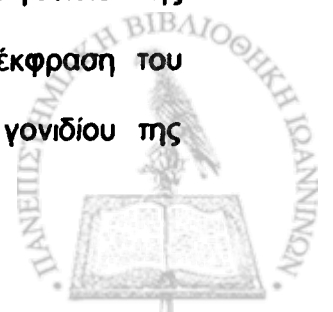
Η ρεζιστίνη και η αδιπονεκτίνη αποτελούν δύο παραδείγματα τέτοιων ουσιών και θεωρήθηκαν ότι αποτελούν το συνδετικό κρίκο ανάμεσα στην παχυσαρκία και στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Η ρεζιστίνη ταυτοποιήθηκε κατά τον έλεγχο για πιθανά γονίδια που επάγονται κατά την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και θεωρήθηκε ότι επηρεάζει τον μεταβολισμό της γλυκόζης τροποποιώντας τη δράση της ινσουλίνης (195).



Η αδιπονεκτίνη, από την άλλη πλευρά, έχει την ιδιαιτερότητα, σε αντίθεση με τις άλλες λιποκυτταροκίνες, να έχει μειωμένα επίπεδα σε παχύσαρκα άτομα και σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (196,197). Έχει βρεθεί ότι χορήγηση αδιπονεκτίνης σε ζώα-πειραματικά μοντέλα παχυσαρκίας βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη (198). Επίσης τα επίπεδα αδιπονεκτίνης αυξάνουν με τη χορήγηση PPAR-γ αγωνιστών (199). Πρόσφατες μελέτες σε knockout ποντίκια επιβεβαίωσαν τη σημασία της αδιπονεκτίνης στην ευαισθησία στη δράση της ινσουλίνης καθώς και τις αντιαθηρογόνες ιδιότητές της (200,201).

Εκτός από τη λειτουργική σημασία αυτών των πρωτεϊνών, τόσο το γονίδιο της ρεζιστίνης όσο και της αδιπονεκτίνης, έχουν χαρτογραφηθεί κοντά σε γονιδιακές θέσεις που έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του ΣΠΩ και του μεταβολικού συνδρόμου αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, το γονίδιο της ρεζιστίνης βρίσκεται περίπου 420 Kbp από τη γονιδιακή θέση D19S884 του γονιδίου του υποδοχέα της ινσουλίνης, με την οποία έχει βρεθεί ότι υπάρχει ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης και συσχέτιση με το ΣΠΩ (195,137). Ενώ, το γονίδιο της αδιπονεκτίνης βρίσκεται στη θέση 3q27, με την οποία θέση έχει βρεθεί συσχέτιση με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και το μεταβολικό σύνδρομο (202). Αυτές οι διαπιστώσεις καθιστούν τα δύο αυτά γονίδια υποψήφια για την παθογένεια της αντίστασης στην ινσουλίνη αλλά και του ΣΠΩ.

Έχουν μελετηθεί πολλοί πολυμορφισμοί, τόσο του γονιδίου της ρεζιστίνης όσο και της αδιπονεκτίνης, για πιθανή συσχέτισή τους με δείκτες αντίστασης στην ινσουλίνη και την ανάπτυξη σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Στη συγκεκριμένη μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης και των πολυμορφισμών 45T/G και 276G/T του γονιδίου της αδιπονεκτίνης. Η επιλογή των συγκεκριμένων πολυμορφισμών έγινε για δύο λόγους: πρώτον, ο πολυμορφισμός -179C/G που βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου της ρεζιστίνης είναι λειτουργικός πολυμορφισμός και επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου και δεύτερον, οι πολυμορφισμοί 45T/G και 276G/T του γονιδίου της



αδипονεκτινης έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν με την παχυσαρκία και με την αντίσταση στην ινσουλίνη σε μελέτες άλλων πληθυσμών (203-207).

Όσον αφορά την SHBG, ο ρόλος της είναι καθοριστικός, μιας και συνδέει τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα και ρυθμίζει τη βιοδιαθέσιμότητα τους στους ιστούς-στόχους (208). Τα επίπεδα της SHBG είναι χαμηλά σε ασθενείς με υπερανδρογοναιμία όπως είναι το ΣΠΩ και σε άτομα που κινδυνεύουν να εμφανίσουν σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και καρδιαγγειακή νόσο (209-211). Στο ΣΠΩ, σημαντικές αιτίες για τα χαμηλά επίπεδα της SHBG είναι η υπερανδρογοναιμία και της υπερινσουλιαιμία που χαρακτηρίζουν το σύνδρομο, αλλά και γενετικοί παράγοντες πιθανότατα παίζουν ρόλο.

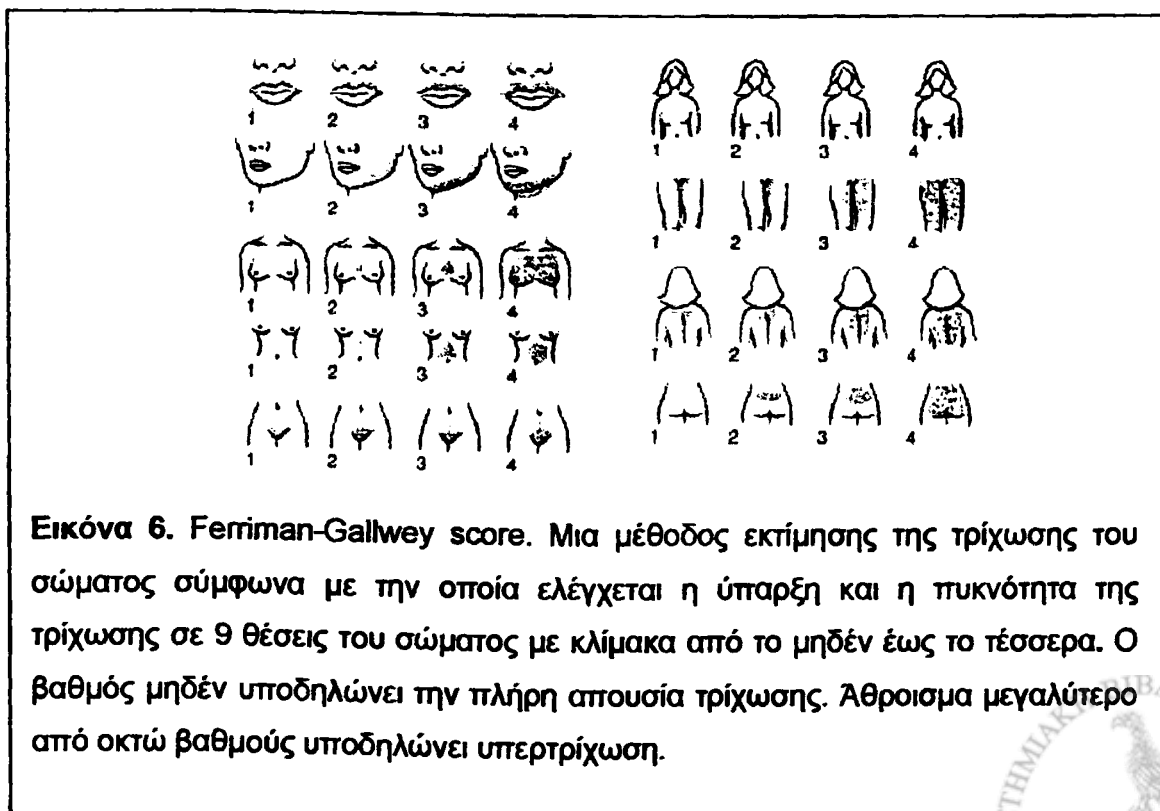
Το γονίδιο της SHBG αποτελείται από 8 εξόνια και βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωματοσώματος 17 (212). Πρόσφατα περιγράφηκε ένας πολυμορφισμός που αποτελείται από επαναλαμβανόμενα πεντανουκλεοτίδια (TAAAA)_n και βρίσκεται στο 5' άκρο του υποκινητή του γονιδίου της SHBG (213). Πρόκειται για ένα λειτουργικό παλυμορφισμό που επηρεάζει τη μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου *in vitro* (213) και επομένως θα μπορούσε να συμβάλλει στις διαφορετικά επίπεδα της SHBG που παρατηρούνται στα διάφορα άτομα επηρεάζοντας με αυτό το τρόπο τη μεταφορά των ορμονών του φύλου στους ιστούς στόχους. Ο πολυμορφισμός (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG είναι ο τρίτος πολυμορφισμός που διερευνήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη για πιθανή συσχέτιση με το ΣΠΩ.



2. ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 180 γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας με ΣΠΩ που προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Ενδοκρινολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 140 γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, υγιείς χωρίς ιστορικό χρόνιων νοσημάτων, με φυσιολογικό καταμήνιο κύκλο (28-30 ημέρες) και χωρίς κλινικά σημεία υπερανδρογοναιμίας. Και οι ασθενείς και η ομάδα ελέγχου είχαν καταγωγή από την ευρύτερη περιοχή της Ηπείρου.

Η διάγνωση του συνδρόμου έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια που προτάθηκαν το 1990 από το συμπόσιο για το ΣΠΩ που διοργάνωσε τα Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού και Ανθρώπινης Ανάπτυξης (National Institutes of Health-National Institute of Child Health and Human Development (NIH-NNICHD) (26). Ως υπερανδρογοναιμία ορίστηκε η κλινική διαπίστωση υπερτρίχωσης (Ferriman-Gallwey score >8, εικόνα 6), ακμής ή αλωπεκίας και/η διαπίστωση υπερανδρογοναιμίας.



Εικόνα 6. Ferriman-Gallwey score. Μια μέθοδος εκτίμησης της τρίχωσης του σώματος σύμφωνα με την οποία ελέγχεται η ύπαρξη και η πυκνότητα της τρίχωσης σε 9 θέσεις του σώματος με κλίμακα από το μηδέν έως το τέσσερα. Ο βαθμός μηδέν υποδηλώνει την πλήρη απουσία τρίχωσης. Άθροισμα μεγαλύτερο από οκτώ βαθμούς υποδηλώνει υπερτρίχωση.

Ως διαταραχή της εμμήνου ρύσεως ορίστηκε η παρουσία oligomenόρροιας ή αμηνόρροιας. Οι γυναίκες δεν ελάμβαναν θεραπεία για τουλάχιστον 6 μήνες πριν τη συμμετοχή τους στη μελέτη με εξαίρεση δύο ασθενείς που βρίσκονταν σε αντισυλληπτική αγωγή και τα επίπεδα της SHBG και της αδιπνονεκτίνης δεν ελήφθησαν υπόψη στην στατιστική ανάλυση..

Όλες οι ασθενείς μελετήθηκαν κατά την πρώιμη θυλακική φάση (3-5^η ημέρα του καταμήνιου κύκλου) μετά από ολονύκτια νηστεία. Όλες οι εξεταζόμενες υποβλήθηκαν σε λεπτομερή λήψη ιατρικού ιστορικού και φυσική εξέταση προς αποκλεισμό άλλων κλινικών καταστάσεων. Έγινε καταγραφή των σωματομετρικών στοιχείων (ύψος και βάρος σώματος) και υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (BMI, Body Mass Index) από τον τύπο:

$$\text{BMI} = \frac{\text{ύψος(Kg)}}{\text{βάρος σώματος}^2 \text{ (m)}}$$

Έγινε μέτρηση γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας, λιπιδαιμικού προφίλ, γοναδοτροπινών, οιστραδιόλης, ολικής τεστοστερόνης, DHEAS, SHBG, 17-υδρόξυπρογεστερόνης, TSH, FT4, T3 και προλακτίνης. Υπολογίστηκε το Ελεύθερο Κλάσμα Ανδρογόνων (FAI, Free Androgen Index) ως:

$$\text{FAI} = \frac{\text{ολικής τεστοστερόνης(nmol/l)}}{\text{SHBG(nmol/l)}} \times 100.$$

Όσον αφορά τους δείκτες αντίστασης στην ινσουλίνη υπολογίστηκε ο λόγος γλυκόζης/ινσουλίνης νηστείας και ο δείκτης HOMA (homeostasis model assessment index):

$$\text{HOMA} = \frac{\text{γλυκόζη νηστείας (mmol/l)} \times \text{ινσουλίνη νηστείας (}\mu\text{U/ml)}}{22,5}$$

Επιπλέον σε 100 ασθενείς (33 φυσιολογικού σωματικού βάρους και 67 υπέρβαρες-παχύσαρκες ασθενείς) έγινε δοκιμασία ανοχής γλυκόζης με 75gr γλυκόζης από το

στόμα (OGTT). Τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας μετρήθηκαν πριν τη λήψη της γλυκόζης, 30, 60, 90, 120 min μετά τη λήψη της γλυκόζης. Υπολογίστηκε η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve, AUC) για τη γλυκόζη και την ινσουλίνη (AUCινσουλίνης και AUCγλυκόζης) σύμφωνα με τη μέθοδο του Tai:

$$AUC = \frac{1}{2} [30(\chi_0 + \chi_{30}) + (\chi_{30} + \chi_{60}) + (\chi_{60} + \chi_{90}) + (\chi_{90} + \chi_{120})]$$

όπου:
 $\chi_0, \chi_{30}, \chi_{60}, \chi_{90}, \chi_{120}$ είναι οι τιμές γλυκόζης ή ινσουλίνης 0, 30, 60, 90, 120min κατά το OGTT

Υπολογίστηκαν επίσης τα επίπεδα της LDL-χοληστερόλης (LDL-C) σύμφωνα με την εξίσωση του Friedewald:

$$LDL-C \text{ (mg/dl)} = \text{ολική χοληστερόλη(mg/dl)} - HDL-C \text{ (mg/dl)} - \text{τριγλυκερίδια(mg/dl)}/5$$

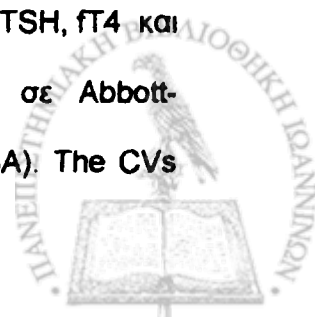
Σε 78 ασθενείς έγινε μέτρηση αδιπνονεκτίνης σε ορούς που στάλθηκαν στο τμήμα της Κλινικής Βιοχημείας στο Νοσοκομείο Παιδων «Αγία Σοφία» στην Αθήνα.

Και από τις δύο ομάδες μελέτης έγινε λήψη δείγματος αίματος που αποθηκεύτηκε στους -20°C και χρησιμοποιήθηκε για τη γενετική μελέτη.

3. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Το σάκχαρο ορού μετρήθηκε με τη μέθοδο της εξωκινάσης (Olympus 600, Clinical Chemistry Analyser, Olympus Diagnostica GmbH, Ireland) με (CV) <3%. Η μέτρηση της ινσουλίνης έγινε με τη μέθοδο Microparticle Enzyme Immunoassay με AXSYM Immunoanalyser (Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) έχοντας CV=5%.

Η ολική τεστοστερόνη και οι γοναδοτροπίνες (LH, FSH) η προλακτίνη η TSH, fT4 και T3 μετρήθηκαν με Chemiluminescent Microparticle Immunoassay σε Abbott-ARCHITECT Immunoanalyser (Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). The CVs



ήταν 4% για την ολική τεστοστερόνη, 3,5% για την LH, και 4% για την FSH, 4,5% για την προλακτίνη, 3,5% για την TSH, 6% για την fT4 και 4,5% για την T3.

Η DHEA-S και η SHBG μετρήθηκαν με Chemiluminescent Immunometric method (IMMULITE 2000 Immunoanalyser, DPC, CA, USA) και η συγκέντρωση της 17α-υδροξυπρογεστερόνη μετρήθηκε με ELISA (IBL). Τα CVs για την DHEAS ήταν 9% για τις υψηλές τιμές και 13% για τις χαμηλές τιμές ενώ για την SHBG και την 17α-υδροξυπρογεστερόνη ήταν 5,5% και 10% αντίστοιχα.

Η ολική χοληστερόλη, η HDL-χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια μετρήθηκαν με ενζυματικές φωτομετρικές μεθόδους (Olympus 600, Clinical Chemistry Analyser, Olympus Diagnostica GmbH, Ireland) με CV<3%. Τέλος η μέτρηση της αδιπνονεκτίνης έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδο (R&D Systems Inc, Minneapolis, USA) έχοντας CV=2.5-4.7%.

4. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν είναι οι εξής:

- ο πολυμορφισμός -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης
- οι πολυμορφισμοί 45T/G και 276G/T του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης
- ο πολυμορφισμός (TAAAA)n του γονιδίου της SHBG

Πρόκειται για σημειακούς πολυμορφισμούς πολυμορφισμοί (SNPs) με εξαίρεση τον πολυμορφισμό του γονιδίου της SHBG είναι ανήκει στην κατηγορία των VNTR.

Η γενετική ανάλυση των πολυμορφισμών περιλαμβάνει:

- Εξαγωγή DNA από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος
- Εκλεκτική ενίσχυση του γενωμικού DNA που περιέχουν τους αντίστοιχους πολυμορφισμούς με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

-Πέψη των προϊόντων της αντίδρασης PCR με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και προσδιορισμός των μοριακών παραλλαγών των πολυμορφισμών μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης σε πηκτή



αγαρόζης. Εξαιρέση αποτέλεσε ο πολυμορφισμός (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG, για την ταυτοποίηση του οποίου, δεν χρειάστηκε να γίνει πέψη και έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% και στη συνέχεια χρώση με νιτρικό άργυρο.

4.1 Εξαγωγή DNA από περιφερικά λευκοκύτταρα

Το προς μελέτη γενετικό υλικό λαμβάνεται από περιφερικό αίμα (2,5ml αίμα σε αντιπηκτικό EDTA) προκειμένου να γίνει η απομόνωση του DNA από τα περιφερικά λευκοκύτταρα.

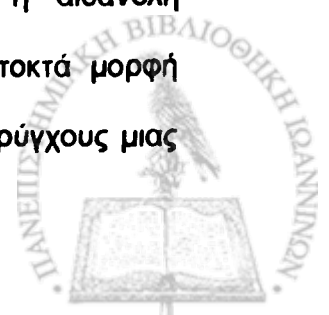
Από κάθε δείγμα λαμβάνονται 750μl αίματος και προστίθονται 750μl TKM και 25μl IGEPAL για την λύση και απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Μετά από ανάδευση το μείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 10.000 στροφές/sec.

Το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα πλένεται με 500μl TKM και μετά από καλή ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 sec στις 10.000 στροφές/sec. Αυτή η διαδικασία του «πλυσίματος των λευκών αιμοσφαιρίων» επαναλαμβάνεται για 3-4 φορές μέχρι να εξαλειφθεί πλήρως το σκούρο χρώμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Στο καθαρό ίζημα των λευκών αιμοσφαιρίων προστίθεται 200μl TKM και 15μl SDS 10% και μετά από καλή ανάδευση τοποθετείται για τουλάχιστον 5 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 55° C προκειμένου να γίνει λύση των λευκών αιμοσφαιρίων.

Στη συνέχεια προστίθονται 80μl διαλύματος χλωριούχου νατρίου 6M για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Ακολουθεί και πάλι καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 12.000 στροφές/sec.

Μετά τη φυγοκέντρηση μεταφέρεται προσεκτικά το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει διαλυμένο το DNA, και προστίθονται 750μl απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης θερμοκρασίας -20°C. Μετά από προσεκτική ελαφρά ανάδευση η αιθανόλη απομακρύνει τα μόρια νερού από το διαλυμένο DNA το οποίο αποκτά μορφή επιπλέοντος βλενώδους υλικού και απομονώνεται με τη βοήθεια του ρύγχους μιας



πιπέτας και διαλύεται σε 50 μl TE. Με αυτή τη μορφή φυλάσσεται για όσο διάστημα χρειαστεί στους 4°C.

Η σύσταση των διαφόρων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή του DNA είναι η εξής:

TKM: 10mM Tris-HCl (pH=7,6), 10mM KCl, 2mM EDTA, 4mM MgCl₂

IGEPAL (Sigma)

SDS: Sodium dodecyl sulphate 10% (Sigma)

TE: 10mM Tris-HCl (pH=7,8), 1mM EDTA (pH=8)

4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια απλή μέθοδος πολλαπλασιασμού του DNA που προσφέρει μεγάλη ευαισθησία και ταχύτητα. Αναλυτικότερα η PCR χωρίζεται σε τρία στάδια (Εικόνα 7):

1. Στάδιο αποδιάταξης του DNA (denaturation)

Η αντίδραση θερμαίνεται στους 92-96°C για 30-60sec. Με αυτό τον τρόπο σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν της δύο αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA και το DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνο.

2. Στάδιο υβριδισμού του γενωμικού DNA με τους εκκινητές (annealing)

Σε αυτό το στάδιο με μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης (50°C-65°C) επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών (primers) στα αντίστοιχα σημεία των ανοικτών αλυσίδων του DNA. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 15-25 βάσεων τα οποία αφορίζουν την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιάσουμε. Αποτελούνται από διαφορετικές μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους, αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA. Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου είναι καθοριστική και υπολογίζεται σύμφωνα με τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών.

3. Στάδιο επιμήκυνσης-σύνθεσης νέου DNA (extension)



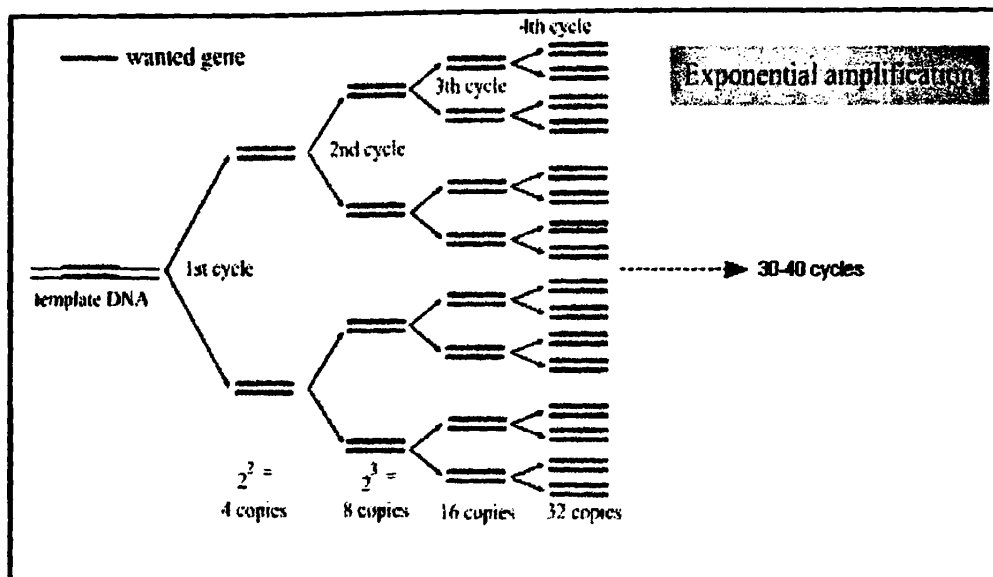
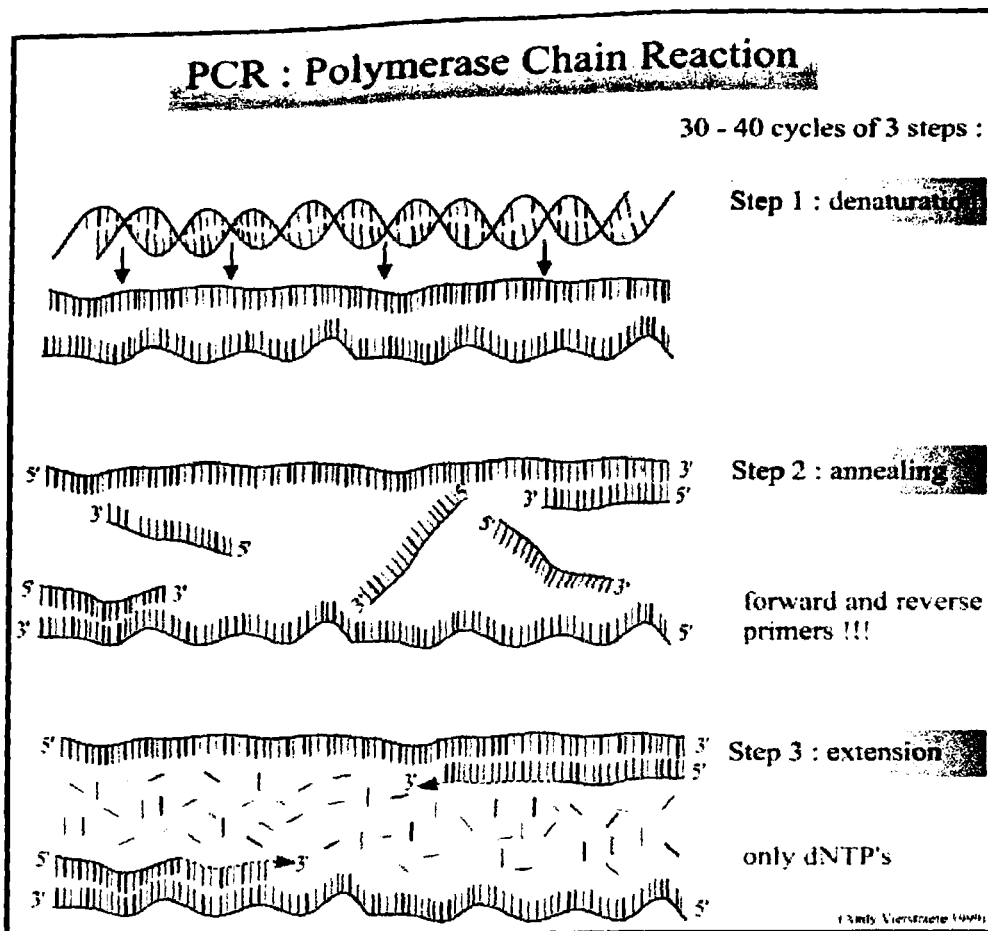
Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών σε θερμοκρασία 72°C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράσης (Taq DNA polymerase). Πρόκειται για ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο και μιμείται τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του κυτταρικού πυρήνα διπλασιάζουν το DNA προκειμένου το κύτταρο να προχωρήσει σε μίτωση και μπορεί να συνθέσει περίπου 2000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό.

Σε μια τυπική ανάλυση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί συνήθως 30-40 φορές. Η διαδικασία είναι εκθετική αφού τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα από τον προηγούμενο κύκλο χρησιμοποιούνται ως νέα καλούπια για τον επόμενο κύκλο πολλαπλασιασμού καταλήγοντας έτσι στο σχηματισμό περισσότερων από 2^{30} ή 1 δισεκατομμυρίου ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA.

Για τη διεξαγωγή της αντίδρασης γίνεται ένα διάλυμα που αποτελείται από: το προς ανάλυση γενομικό DNA, κατάλληλο ζεύγος εκκινητών, ιόντα μαγνησίου, ισομοριακό μείγμα των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων [dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Promega), Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen, Life Technologies, USA) και ρυθμιστικό διάλυμα που συνοδεύει την πολυμεράση.

Όλη η διαδικασία προετοιμασίας του διαλύματος της αντίδρασης γίνεται με γάντια, μέσα σε ειδικές θήκες με πάγο και τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα. Στο διάλυμα προστίθεται παραφινέλαιο σαν επικάλυψη για προστασία από την εξάτμιση καθώς στη συνέχεια θα εκτεθεί σε υψηλές θερμοκρασίες. Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις PCR ήταν αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής: PTC-100 (Peltier-Effect Cycling, MJ Research, Inc, USA). Η αξιολόγηση του προϊόντος PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης εμπλουτισμένη με βρωμιούχο αιθίδιο. Τα προϊόντα PCR διατηρούνται σε θερμοκρασία -20°C.



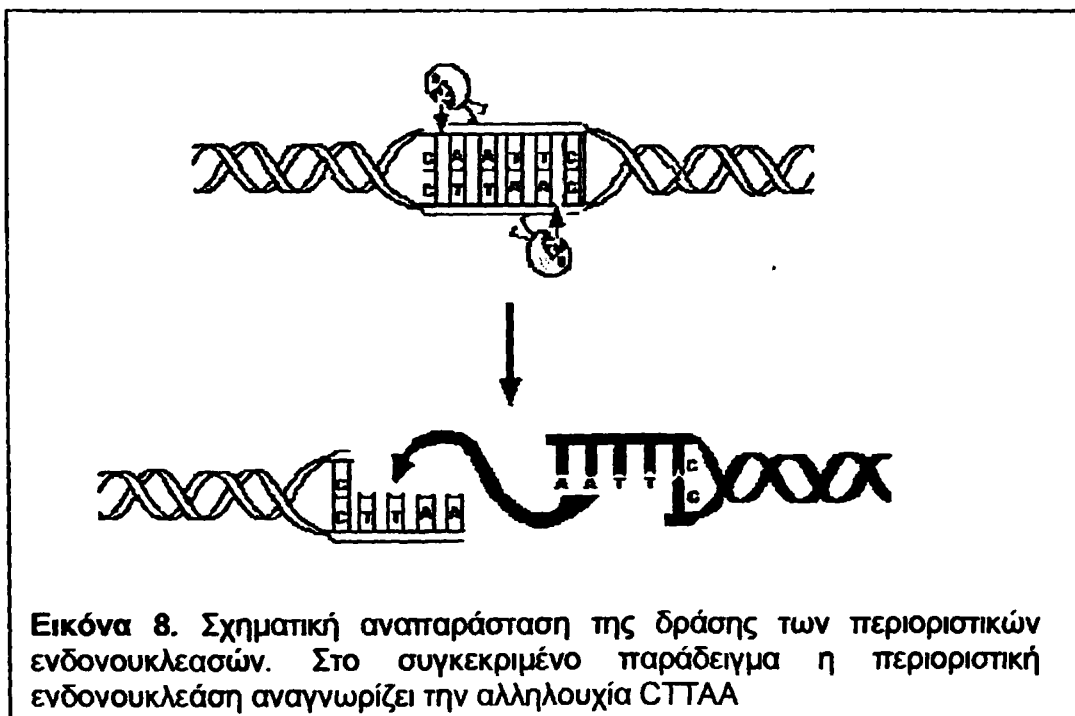


Εικόνα 7. Διαγραμματική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης



4.3 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες του DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν μήκος συνήθως 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες, δηλαδή διαβάζονται το ίδιο και από τις δύο κατευθύνσεις του DNA (5'→3' και 3'→5') (Εικόνα 8). Ένας πολυμορφισμός μπορεί να εξαλείψει ή να δημιουργήσει μια θέση αναγνώρισης από περιοριστική ενδονουκλεάση. Εάν επωάσουμε το προϊόν PCR με τη κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση σε κατάλληλες συνθήκες και συνέχεια ηλεκτροφορήσουμε το προϊόν της πέψης θα δούμε τμήματα διαφορετικού μεγέθους και έτσι θα ταυτοποιηθεί ο πολυμορφισμός.



4.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης.

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει το διαχωρισμό των τμημάτων DNA σύμφωνα με το μέγεθος τους. Η πηκτική αγαρόζης είναι εμπλουτισμένη με 0,5mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα TBE (89mM Tris-HCl, 89mM Boric acid, 2.5mM EDTA pH=8.0) Η ταχύτητα κίνησης και επομένως η απόσταση που διανύουν μέσα στη πηκτική αγαρόζης εξαρτάται από:

- το μοριακό βάρος του DNA (αντιστρόφως ανάλογη)

- τη συγκέντρωση της αγαρόζης (μικρή συγκέντρωση αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA ενώ μεγαλύτερη συγκέντρωση χρησιμοποιείται για τα μικρά τμήματα.

- τη διαμόρφωση του DNA (κυκλικό, γραμμικό)

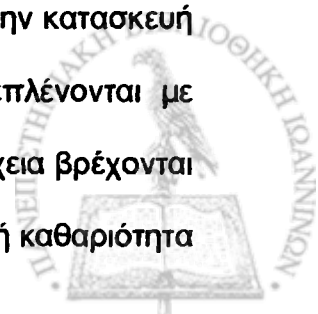
- τη διαφορά τάσης του ηλεκτροφορητικού πεδίου. Σε χαμηλή τάση ρεύματος (Volt) η κινητικότητα του γραμμικού DNA είναι ανάλογη της τάσης και η δυνατότητα διαχωρισμού ελαττώνεται όταν αυξάνεται η τάση του ρεύματος.

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε πηκτική αγαρόζης 2% και 3%. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η HORIZON 11-14 (GIBRO BRL, USA) Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί ανάγνωση και φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών σε υπεριώδες φως. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι αυτό που δίνει έντονο πορτοκαλί χρώμα φθορισμού όταν είναι δεσμευμένο σε DNA.

4.5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου.

Η ταυτοποίηση του (TAAAA)_n πολυμορφισμού της SHBG έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%. Για τη κατασκευή της πηκτικής πολυακρυλαμιδίου ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Αρχικά γίνεται καθαρισμός των τζαμιών που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του πηκτώματος σχολαστικά με σφουγγάρι και απορρυπαντικό. Ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό και στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί. Στη συνέχεια βρέχονται με αιθανόλη και αφήνονται να στεγνώσουν. Η πολύ καλή και σχολαστική καθαριότητα



των τζαμιών είναι απαραίτητη καθώς αποτρέπει τη δημιουργία φυσαλίδων κατά την έγχυση του διαλύματος πολυακρυλαμιδίου.

2. Ανάμεσα στα καθαρά τζάμια τοποθετούνται οι δύο ταινίες πλάτους 2cm και πάχους 1mm (spacers) που αφήνουν τον απαραίτητο χώρο μεταξύ των τζαμιών για τον πολυμερισμό του πηκτώματος. Τοποθετείται επίσης η ειδική ταινία στεγανοποίησης προκειμένου να μη γίνει διαφυγή του διαλύματος ακρυλαμιδίου πριν αυτό πολυμεριστεί. Τα τζάμια συγκρατούνται με ειδικούς σφιγκτήρες γίνεται η έγχυση του διαλύματος ακρυλαμιδίου προσεκτικά ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες και τοποθετείται το κατάλληλο χτένι για τη δημιουργία θέσεων (πηγαδάκια) όπου θα τοποθετηθούν τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα.

3. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και η ολοκλήρωση του πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου ολοκληρώνεται σε 1-2 ώρες. Όταν ο πολυμερισμός ολοκληρωθεί απομακρύνεται το χτένι και η ειδική ταινία στεγανοποίησης. Τα τζάμια με το πηκτωμα στερεώνονται στην ειδική βάση και βυθίζονται στο διάλυμα TBE της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή V20-CDC (UK).

4. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση για περίπου 20 ώρες σε τάση 55-60 Volt. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης απομακρύνονται τα τζάμια και με προσοχή αφαιρείται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προκειμένου να ακολουθήσει η χρώση με νιτρικό άργυρο.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου είναι τα εξής:

Acrylamide και N'N'-methylene-bis-acrylamide σε αναλογία 29:1

TBE: 89mM Tris-HCl, 89mM Boric acid, 2,5mM EDTA pH=8,0

APS: ammonium persulfate 20%.

TEMED: N,N,N,N,-Tetramethylethylenediamine 2%

Προετοιμάζονται 50ml πηκτής πολυακρυλαμιδίου 12% ως εξής:

- 15ml διαλύματος acrylamide/bis-acrylamide



- 35ml TBE 1X
- 286μl APS
- 57μl TEMED

Τα APS και TEMED είναι απαραίτητα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.

4.6 Χρώση νιτρικού αργύρου

Για τη χρώση νιτρικού αργύρου χρειάζονται τα εξής διαλύματα:

Διάλυμα σταθεροποίησης

- 40ml αιθανόλη extra pure (99.7-100%)
- 2ml οξικό οξύ
- Δισαπτεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 400ml.

Διάλυμα νιτρικού αργύρου 1%.

Διάλυμα εμφάνισης

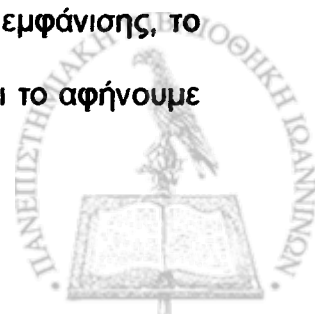
- 800μl φορμαλδεΐδη 37%
- 3gr NaOH (extra pure)
- 0,02gr Sodium Borohydride (NaBH_4)
- Δισαπτεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 200ml.

Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

Αρχικά η πηκτή πολυακρυλαμιδίου βυθίζεται σε 200ml από το διάλυμα σταθεροποίησης και αφήνεται για 3min. Απομακρύνεται το διάλυμα και προστίθεται το υπόλοιπο διάλυμα σταθεροποίησης (200ml) για άλλα 3min.

Αφαιρούμε το προηγούμενο διάλυμα και προσθέτουμε 200ml διαλύματος νιτρικού αργύρου για 10min υπό συνεχή ανάδευση.

Αφαιρούμε το διάλυμα νιτρικού αργύρου και ξεπλένουμε με δισαπτεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Προσθέτουμε το τελευταίο διάλυμα, το διάλυμα εμφάνισης, το οποίο προηγουμένως έχουμε αναδεύσει και θερμάνει στους 100°C και το αφήνουμε μέχρι την εμφάνιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών.



5. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ.

5.1 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ -179C/G ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΡΕΖΙΣΤΙΝΗΣ

Συνθήκες αντίδρασης PCR

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης : Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 25μl που περιείχε:

DNA (300-500ng)	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCl, 200mM Tris-HCl, pH=8,4)	2,5 μl
dNTPs (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2mM	2,5 μl
Ιόντα μαγνησίου (MgCl ₂) 1,5mM	0,5 μl
Εκκινητής 1 (2pmol/μl)	0,39μl
Εκκινητής 2 (2pmol/μl)	0,98 μl
Taq DNA πολυμεράση (1U/μl)	0,25 μl
Διασπεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 25 μl	16,88 μl

Αλληλουχία εκκινητών

Εκκινητής 1: 5'-TGT CAT TCT CAC CCA GAG ACA-3'

Εκκινητής 2: 5'-TGG GCT CAG CTA ACC AAA TC-3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

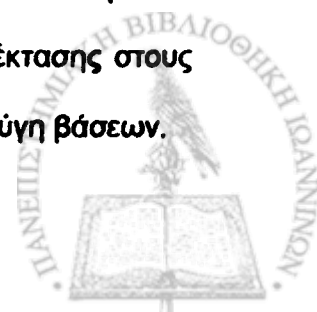
Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing): 94°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing): 57°C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension): 72°C για 90 δευτερόλεπτα

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 30 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά. Το προϊόν PCR που προκύπτει έχει μέγεθος 533 ζεύγη βάσεων.



Ακολουθεί ολονύκτια επώαση των προϊόντων PCR με την περιοριστική ενδονουκλεάση EarI (BioLabs Inc, New England) στους 37°C.

Οι συνθήκες πέψης είναι οι ακόλουθες:

Προϊόν PCR	4 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (10mM BisTris Propane-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1mM DTT) pH=7,0	1 μl
EarI (10U/μl)	0,1 μl
Δισαππεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 10 μl	4,9 μl

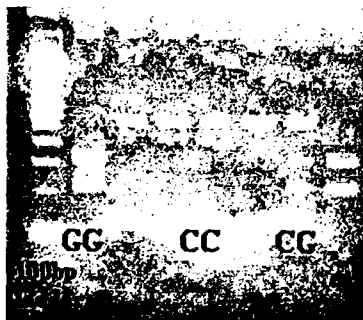
Αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EarI

Το ένζυμο EarI αναγνωρίζει την αλληλουχία CTCTTC και κατατέμνει την αλυσίδα DNA που περιέχει τη συγκεκριμένη αλληλουχία 1 θέση πιο κάτω και τη συμπληρωματική της 4 θέσεις πιο κάτω

Σημείο κοπής της κάθε μιας από τις συμπληρωματικές έλικες του DNA από το EarI:



Από την πέψη προκύπτουν δύο τμήματα μεγέθους 207 ζεύγη βάσεων και 326 ζεύγη βάσεων. Η παρουσία του σημείου περιορισμού EarI χαρακτηρίζει το G αλληλόμορφο ενώ η απουσία το C αλληλόμορφο. Συνεπώς προκύπτουν 3 γονότυποι CC, CG, GG, ο καθορισμός των οποίων γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%. Το πρότυπο της ηλεκτροφόρησης είναι το ακόλουθο:



5.2 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ 45T/G ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΑΔΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗΣ

Συνθήκες αντίδρασης PCR

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης : Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 25μl που περιείχε:

DNA (300-500ng)	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCl, 200mM Tris-HCl, pH=8,4)	2,5 μl
dNTPs (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2mM	2,5 μl
Ιόντα μαγνησίου (MgCl ₂) 1,5mM	0,5 μl
Εκκινητής 1 (2pmol/μl)	0,98μl
Εκκινητής 2 (2pmol/μl)	0,84 μl
Taq DNA πολυμεράση (1U/μl)	0,5 μl
Δισαπτεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 25 μl	16,18 μl

Αλληλουχία εκκινητών

Εκκινητής 1: 5'- GAA GTA GAC TCT GCT GAG ATG G -3'

Εκκινητής 2: 5'- TAT CAG TGT AGG AGG TCT GTG ATG -3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

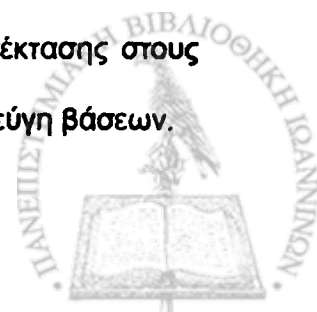
Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing): 94°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing): 60°C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension): 72°C για 90 δευτερόλεπτα

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 30 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά. Το προϊόν PCR που προκύπτει έχει μέγεθος 372 ζεύγη βάσεων.



Ακολουθεί ολονύκτια επώαση των προϊόντων PCR με την περιοριστική ενδονουκλεάση SmaI (BioLabs Inc, New England) στους 25°C.

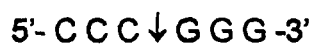
Οι συνθήκες πέψης είναι οι ακόλουθες:

Προϊόν PCR	5 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (50mM potassium acetate, 20mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1mM DTT), pH=7,9	1 μl
SmaI (20U/μl)	0,25 μl
Δισαπτεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 10 μl	3,75 μl

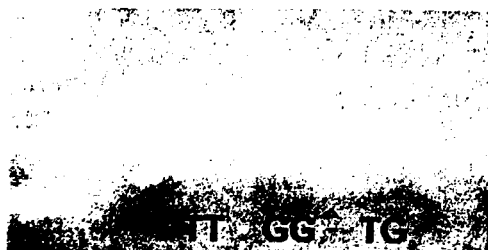
Αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης SmaI

Το ένζυμο SmaI αναγνωρίζει την αλληλουχία CCGGG

Σημείο κοπής της κάθε μιας από τις συμπληρωματικές έλικες του DNA από το SmaI:



Από την πέψη προκύπτουν δύο τμήματα μεγέθους 216 ζεύγη βάσεων και 156 ζεύγη βάσεων. Η παρουσία του σημείου περιορισμού SmaI χαρακτηρίζει το G αλληλόμορφο ενώ η απουσία το T αλληλόμορφο. Συνεπώς προκύπτουν 3 γονότυποι TT, TG, GG, ο καθορισμός των οποίων γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 3%. Το πρότυπο της ηλεκτροφόρησης είναι το ακόλουθο:



5.3. ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ 276G/T ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΑΔΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗΣ

Συνθήκες αντίδρασης PCR

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης : Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 25μl που περιείχε:

DNA (300-500ng)	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCl, 200mM Tris-HCl, pH=8,4)	2,5μl
dNTPs (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2mM	2,5μl
Ιόντα μαγνησίου (MgCl ₂) 1,5mM	0,6μl
Εκκινητής 1 (2pmol/μl)	1,42μl
Εκκινητής 2 (2pmol/μl)	1,44μl
Taq DNA πολυμεράση (1U/μl)	0,3μl
Δισαπτεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 25 μl	15,24μl

Αλληλουχία εκκινητών

Εκκινητής 1: 5'- GGC CTC TTT CAT CAC AGA CC -3'

Εκκινητής 2: 5'- AGA TGC AGC AAA GCC AAA GT -3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing): 95°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing): 55°C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension): 72°C για 90 δευτερόλεπτα

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 30 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά. Το προϊόν PCR που προκύπτει έχει μέγεθος 196 ζεύγη βάσεων.



Ακολουθεί ολονύκτια επώαση των προϊόντων PCR με την περιοριστική ενδονουκλεάση BsmI (BioLabs Inc, New England) στους 65°C.

Οι συνθήκες πέψης είναι οι ακόλουθες:

Προϊόν PCR	5μl
Ρυθμιστικό διαλυμα (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl ₂ , 1mM dithiothreitol), pH=7,9	1μl
BsmI (10U/μl)	0,5μl
Δισαπεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 10 μl	3,5μl

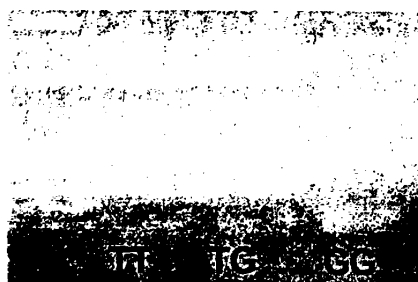
Αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BsmI

Το ένζυμο BsmI αναγνωρίζει την αλληλουχία GAATGC.

Σημείο κοπής της κάθε μιας από τις συμπληρωματικές έλικες του DNA από το BsmI:



Από την πέψη προκύπτουν δύο τμήματα μεγέθους 148 ζεύγη βάσεων και 48 ζεύγη βάσεων. Η παρουσία του σημείου περιορισμού BsmI χαρακτηρίζει το G αλληλόμορφο ενώ η απουσία το T αλληλόμορφο. Συνεπώς προκύπτουν 3 γονότυποι GG GT TT, ο καθορισμός των οποίων γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3%. Το πρότυπο της ηλεκτροφόρησης είναι το ακόλουθο:



5.4 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ (TAAAA)_n ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ SHBG

Συνθήκες αντίδρασης PCR

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης : Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 25μl που περιείχε:

DNA (300-500ng)	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCl, 200mM Tris-HCl, pH=8,4)	2,5 μl
dNTPs (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2mM	2,5 μl
Ιόντα μαγνησίου (MgCl ₂) 1,5mM	0,5 μl
Εκκινητής 1 (2pmol/μl)	1,1 μl
Εκκινητής 2 (2pmol/μl)	0,61 μl
Taq DNA πολυμεράση (1U/μl)	0,25 μl
Δισαππεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 25 μl	16,54 μl

Αλληλουχία εκκινητών

Εκκινητής 1: 5'- GCT TGA ACT CGA GAG GCA G-3'

Εκκινητής 2: 5'- CAG GGC CTA AAC AGT CTA GCA GT-3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing): 94°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing): 59°C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension): 72°C για 90 δευτερόλεπτα

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 30 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά. Το προϊόν PCR που προκύπτει έχει μέγεθος 169 ζεύγη βάσεων (το αλληλόμορφο με τις 8 TAAAA επαναλήψεις).

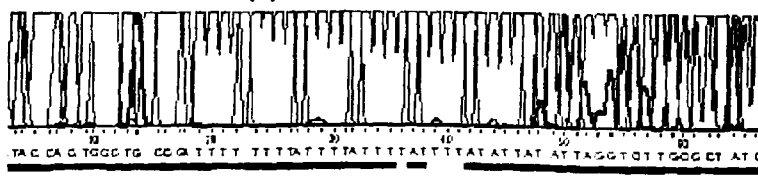


Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός έγινε σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου 12% και ακολούθησε χρώση με νιτρικό άργυρο. Ο αριθμός των (TAAAA)_n επαναλήψεων γίνεται με σύγκριση με γνωστού μεγέθους προϊόντα PCR που ο αριθμός των επαναλήψεων τους ταυτοποιήθηκε με ανάλυση της αλληλουχίας (sequencing):

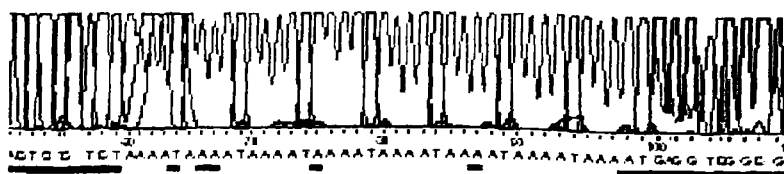
Αλληλόμορφο με 6(TAAAA)



Αλληλόμορφο με 7(TAAAA)



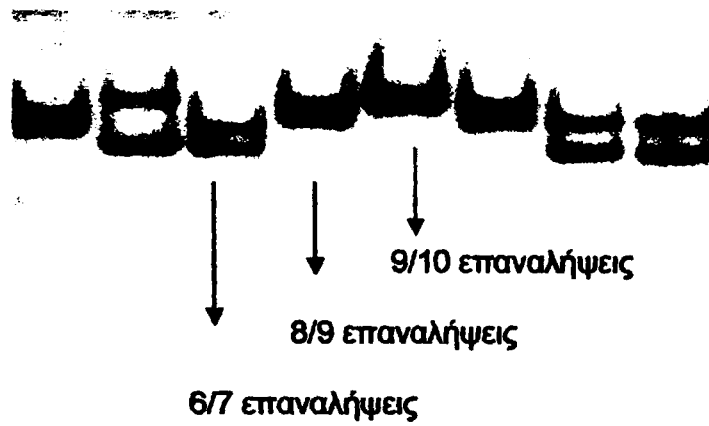
Αλληλόμορφο με 8(TAAAA)



Αλληλόμορφο με 9(TAAAA)



Το πρότυπο της ηλεκτροφόρησης πολυμορφισμού (TAAA)n του γονιδίου της SHBG είναι το ακόλουθο:



6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Αρχικά εξετάστηκε αν ο πληθυσμός μελέτης μας ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg για κάθε πολυμορφισμό που μελετήσαμε, συγκρίνοντας τις συχνότητες των γονοτύπων που παρατηρήσαμε με τις συχνότητες των γονοτύπων που θα αναμέναμε σε τυχαίο δείγμα πληθυσμού (χ^2 τεστ). Η απόκλιση ενός πληθυσμού από την ισορροπία Hardy-Weinberg σημαίνει ότι η επιλογή του δεν έγινε τυχαία και αμερόληπτα και επομένως τα αποτελέσματα που θα εξάγονταν θα ήταν λανθασμένα. Η στατιστική ανάλυση των γονοτυπικών διαφορών καθώς και των διαφορών στη συχνότητα των αλληλομόρφων έγινε με χ^2 τεστ. Για τους γονότυπους που βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα τους ανάμεσα στις γυναίκες με ΣΠΩ και την ομάδα ελέγχου υπολογίστηκαν τα odds ratios.

Η κανονική κατανομή των συνεχών μεταβλητών εκτιμήθηκε με το Kolmogorov-Smirnov τεστ. Στις τιμές της ινσουλίνης, του HOMA, των τριγλυκεριδίων και της αδιπνονεκτίνης έγινε λογαριθμική μετατροπή προκειμένου η κατανομή τους να γίνει κανονική, στους πίνακες που ακολουθούν οι τιμές αυτών των μεταβλητών παρουσιάζονται χωρίς τη λογαριθμική μετατροπή. Η ανάλυση των διαφορών των συνεχών μεταβλητών μεταξύ των γονοτύπων έγινε με t-test για ανεξάρτητες μεταβλητές (για δύο ομάδες) και με one-way ANOVA (για τρεις ομάδες). Η χρήση μη παραμετρικών μεθόδων (Mann Whitney U-test και Kruskal Wallis analysis of variance) έδωσε παρόμοια αποτελέσματα. Προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο της ανεξάρτητης επίδρασης των μελετηθέντων γονοτύπων έγινε πολυπαραγοντική ανάλυση (MANOVA).

Όλα τα αποτελέσματα των συνεχών μεταβλητών καταγράφονται ως μέση τιμή \pm SD.

Ως στατιστικά σημαντική διαφορά θεωρήθηκε η τιμή του $p < 0,05$. Όλες οι αναλύσεις έγιναν με το στατιστικό πακέτο Statistica Software Package (version 5.1, Statsoft Inc, USA).

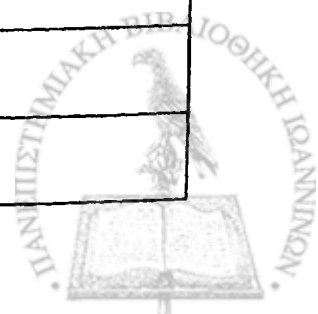


7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των γυναικών με ΣΠΩ φαίνονται στον Πίνακα 2. Η ομάδα ελέγχου ήταν γυναίκες αντίστοιχης ηλικίας με φυσιολογικό σωματικό βάρος, χωρίς κλινική υπερανδρογοναιμία και με φυσιολογικούς καταμήνιους κύκλους.

Πίνακας 2. Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των γυναικών με ΣΠΩ

Ηλικία (έτη)	22,8±5,9
BMI (Kg/m ²)	28,0±7,5
LH/FSH	1,4±1,1
SHBG (nmol/l)	37,5±26,1
Ολική τεστοστερόνη (nmol/l)	3,4±1,5
FAI	13,5±11,8
Γλυκόζη/ινσουλίνη νηστείας	9,6±7,5
HOMA	3,8±4,8
AUCγλυκόζης	14791±3120
AUCινσουλίνης	11303±9785
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	180,3±33,3
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	85,7±53,2
HDL-χοληστερόλη (mg/dl)	47,2±13,9
LDL-χοληστερόλη (mg/dl)	163,2±30,0



Πολυμορφισμός -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης

Ο πολυμορφισμός -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης βρίσκονται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) και άρα δεν υπάρχει επιλεκτική πίεση στην ομάδα μελέτης. Η κατανομή των γονότυπων και των αλληλομόρφων φαίνεται στον Πίνακα 3. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα αυτού του πολυμορφισμού ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς γυναίκες. Έγινε σύγκριση ασθενών που είχαν γονότυπο CC με ασθενείς με γονότυπους CG και GG και βρέθηκε ότι οι ασθενείς με ΣΠΩ είχαν αυξημένο BMI σε σχέση με τη δεύτερη υποομάδα. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά τους δείκτες αντίστασης στην ινσουλίνη και τα λιπίδια μεταξύ των γονοτύπων αυτού του πολυμορφισμού (Πίνακας 4)

Πίνακας 3. Η κατανομή των συχνοτήτων των γονότυπων και των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης στις γυναίκες με ΣΠΩ και τις υγιείς γυναίκες. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά συγκρίνοντας τις δύο ομάδες.

			ΣΠΩ	Ομάδα ελέγχου
Αριθμός ατόμων			180	140
-179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης	Γονότυποι n(%)	CC	93 (51,7%)	73 (52,1%)
		CG	78 (43,3%)	56 (40%)
		GG	9 (5%)	11 (7,9%)
	Αλληλόμορφα n(%)	C	264 (73,3%)	202 (72,1%)
		G	96 (26,7%)	78 (27,9%)



Πίνακας 4. Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των γονοτύπων του πολυμορφισμού -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης σε γυναίκες με ΣΠΩ. (ns=μη σημαντική διαφορά)

	γονότυπος CC	γονότυποι CG+GG	p
Αριθμός ατόμων	93	87	
Ηλικία (έτη)	22,3±5,4	23,4±6,4	ns
BMI(Kg/m ²)	29,0±7,8	26,7±6,8	0,045
LH/FSH	1,3±0,9	1,5±1,3	ns
SHBG (nmol/l)	34,8±20,1	35,1±19,3	ns
Ολική τεστοστερόνη (nmol/l)	3,3±1,4	3,6±1,6	ns
FAI	12,3±9,7	14,6±13,6	ns
Γλυκόζη/ινσουλίνη νηστείας	8,7±6,5	10,5±8,3	ns
HOMA	3,6±2,8	3,4±3,2	ns
AUCγλυκόζης (αριθμός ασθενών)	14949±3216 (53)	14613±3030 (47)	ns
AUCινσουλίνης (αριθμός ασθενών)	12534±11862 (53)	9781±6174 (47)	ns
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	179,0±32,8	181,9±34,0	ns
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	79,4±35,4	93,1±68	ns
HDL-χοληστερόλη (mg/dl)	46,3±15,3	48,3±12,0	ns
LDL-χοληστερόλη (mg/dl)	163,1±31,9	163,3±27,9	ns

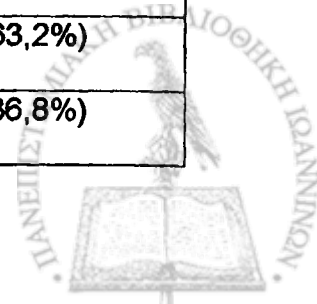


Πολυμορφισμοί 45T/G και 276G/T του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης

Στον Πίνακα 5 φαίνονται οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των γονοτύπων των πολυμορφισμών 45T/G και 276G/T του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης στις γυναίκες με ΣΠΩ και τις υγιείς γυναίκες. Και οι δύο πολυμορφισμοί βρίσκονται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) και στους δύο πληθυσμούς. Επίσης οι δύο πολυμορφισμοί είναι σε ανισορροπία σύνδεσης (χ^2 , $p < 0,001$). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων ανάμεσα στις γυναίκες με ΣΠΩ και τις υγιείς γυναίκες.

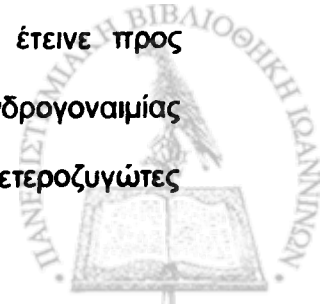
Πίνακας 5. Η κατανομή των συχνοτήτων των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης στις γυναίκες με ΣΠΩ και τις υγιείς γυναίκες. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά συγκρίνοντας τις δύο ομάδες.

			ΣΠΩ	Ομάδα ελέγχου
Αριθμός ατόμων			180	140
45T/G του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης	Γονότυποι n(%)	TT	132 (73,3%)	106 (75,7%)
		TG	45 (25,0%)	30 (21,4%)
		GG	3 (1,7%)	4 (2,9%)
	Αλληλόμορφα n(%)	T	309 (85,8%)	242 (86,4%)
		G	51 (14,2%)	38 (13,6%)
276G/T του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης	Γονότυποι n(%)	GG	76 (42,2%)	52 (37,2%)
		GT	83 (46,1%)	73 (52,1%)
		TT	21 (11,7%)	15 (10,7%)
	Αλληλόμορφα n(%)	G	235 (65,3%)	177 (63,2%)
		T	125 (34,7%)	103 (36,8%)



Όσον αφορά τον πολυμορφισμό 45T/G του γονιδίου της αδιπονεκτίνης οι βιοχημικές διαφορές των γονοτύπων φαίνονται στον πίνακα 6. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς το BMI, ορμονικές παραμέτρους και λιπιδαιμικό προφίλ. Ωστόσο, στους ασθενείς που έγινε καμπύλη ανοχής γλυκόζης, οι TT ομοζυγώτες ασθενείς σε σύγκριση με ασθενείς με γονότυπο TG και GG είχαν χαμηλότερα επίπεδα ινσουλίνης 90 λεπτά ($86,8 \pm 81,7 \mu\text{U/ml}$ Vs $145,0 \pm 128,7 \mu\text{U/ml}$, $p=0,0025$) και 120 minutes μετά τη λήψη της γλυκόζης ($66,3 \pm 51,0 \mu\text{U/ml}$ Vs $93,9 \pm 73,5 \mu\text{U/ml}$, $p=0,03$), ενώ δεν διέφεραν τα βασικά επίπεδα ινσουλίνης και τα επίπεδα της AUCγλυκόζης. Ως αποτέλεσμα οι TT ομοζυγώτες ασθενείς είχαν χαμηλότερα επίπεδα AUCινσουλίνης (Σχήμα 1), ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε άλλους δείκτες αντίστασης στην ινσουλίνη (λόγο γλυκόζη/ινσουλίνη νηστείας και δείκτη HOMA). Η συσχέτιση του γονότυπου TT με μειωμένα επίπεδα υπερινσουλιναϊμίας και επομένως με αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη παρέμεινε σημαντική και μετά από προσαρμογή ως προς την ηλικία, το BMI και τα επίπεδα της AUCγλυκόζης ($p=0.003$ για τις διαφορές των επιπέδων ινσουλίνης στα 90 λεπτά, $p<0.05$ για τις διαφορές των επιπέδων ινσουλίνης στα 120 λεπτά και $p=0.05$ για τα επίπεδα της AUCινσουλίνης). Συνολικά στα επίπεδα αδιπονεκτίνης στον όρο των ασθενών παρατηρήθηκε τάση προς χαμηλότερα επίπεδα στις ασθενείς με γονότυπους TG και GG, οι γονότυποι με τη μεγαλύτερη αντίσταση στην ινσουλίνη, αλλά αυτή η συσχέτιση δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 6).

Τα χαρακτηριστικά των γονοτύπων του πολυμορφισμού 276G/T του γονιδίου της αδιπονεκτίνης φαίνονται στον πίνακα 7. Οι ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες ασθενείς για το G αλληλόμορφο (GG και GT) είχαν αυξημένο BMI ($p=0.01$), αυξημένα επίπεδα AUCγλυκόζης ($p=0.005$) και AUCινσουλίνης ($p=0.01$) σε σύγκριση με τις γυναίκες με ΣΠΩ που είχαν γονότυπο TT. Επιπρόσθετα η πρώτη υποομάδα έτεινε προς χαμηλότερα επίπεδα SHBG ($p=0,06$) και μεγαλύτερο βαθμό υπερανδρογοναιμίας (FAI, $p=0,09$). Όσον αφορά το λιπιδαιμικό προφίλ, οι ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες



ασθενείς για το G αλληλόμορφο είχαν υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($p=0.015$) και χαμηλότερα επίπεδα HDL-χοληστερόλης ($p=0.04$) σε σύγκριση με τις γυναίκες με ΣΠΩ που είχαν γονότυπο TT . Τα επίπεδα αδιπνονεκτίνης του ορού ήταν σημαντικά χαμηλότερα στις ασθενείς με γονότυπο GG ή GT σε σχέση με τις TT ομοζυγώτες ασθενείς και αυτή η συσχέτιση παρέμεινε σημαντική και μετά από προσαρμογή ως προς την ηλικία, τα επίπεδα BMI και ινσουλίνης ($p=0,03$, σχήμα 2).

Πίνακας 6 Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των γονοτύπων του πολυμορφισμού 45T/G του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης (ns=μη σημαντική διαφορά)

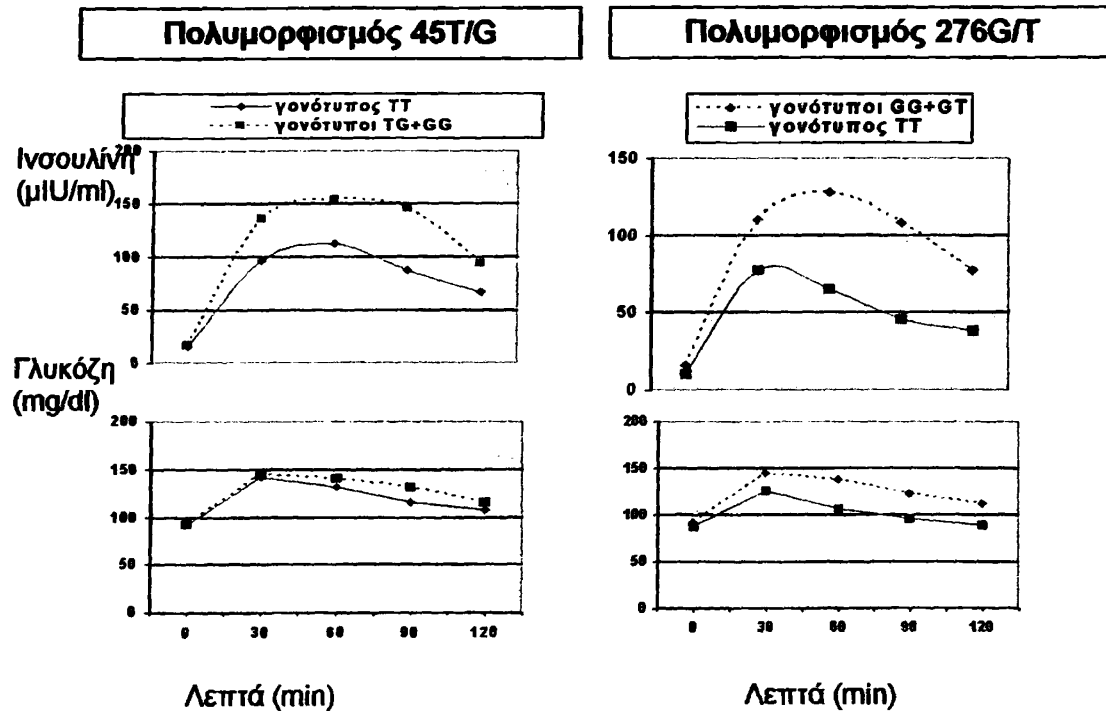
	Γονότυπος TT	Γονότυποι TG+GG	p
Αριθμός ατόμων	132	48	
Ηλικία (έτη)	22,6±5,9	23,3±5,8	ns
BMI (Kg/m ²)	28,0±7,7	28,0±6,8	ns
LH/FSH	1,4±1,0	1,3±1,3	ns
SHBG (nmol/l)	37,8±27,8	35,6±19,4	ns
Ολική τεστοστερόνη (nmol/l)	3,5±1,6	3,3±1,2	ns
FAI	13,7±12,5	12,8±9,8	ns
Γλυκόζη/ινσουλίνη νηστείας	10,1±8,7	8,2±7,0	ns
HOMA	3,9±5,6	3,3±2,1	ns
AUCγλυκόζης (αριθμός ατόμων)	14563±3108 (77)	15588±3193 (23)	ns
AUCινσουλίνης (αριθμός ατόμων)	10095±7478 (77)	15098±14439 (23)	0,045
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	179,5±33,3	182,9±33,5	ns
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	85,7±57,9	85,5±35,7	ns
HDL-χοληστερόλη (mg/dl)	46,4±11,2	49,9±19,8	ns
LDL-χοληστερόλη (mg/dl)	162,3±28,9	165,8±33,5	ns
Αδιπνονεκτίνη (mg/l) (αριθμός ατόμων)	11,5±5,5 (65)	10,8±3,6 (13)	ns

Πίνακας 7. Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των γονότυπων του πολυμορφισμού 276G/T του γονιδίου της αδιπονεκτίνης (ns=μη σημαντική διαφορά)

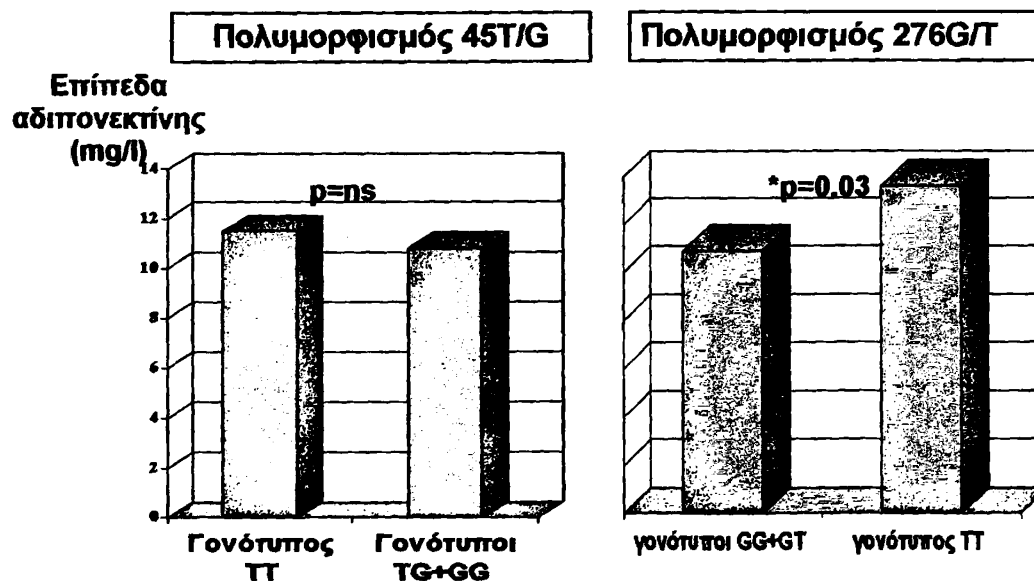
	Γονότυποι GG+GT	Γονότυπος TT	p
Αριθμός ατόμων	159	21	
Ηλικία (έτη)	22,9±6,0	22,1±4,8	ns
BMI(Kg/m ²)	28,5±7,6	24,0±5,0	0,01
LH/FSH	1,4±1,1	1,3±0,8	ns
SHBG (nmol/l)	36,8±26,6	43,2±22,2	0,06
Ολική τεστοστερόνη (nmol/l)	3,5±1,6	2,9±1,4	ns
FAI	14,0±12,2	9,7±8,2	0,09
Γλυκόζη/ινσουλίνη νηστείας	9,5±7,6	9,9±6,2	ns
HOMA	3,6±3,2	2,4±1,1	ns
AUCγλυκόζης (αριθμός ατόμων)	15105±3075 (88)	12492±2492 (12)	0,005
AUCινσουλίνης (αριθμός ατόμων)	11924±10134 (88)	5846±2950 (12)	0,01
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	180,4±33,9	179,8±27,9	ns
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	88,7±55,0	59,5±19,0	0,015
HDL-χοληστερόλη (mg/dl)	46,5±13,7	53,7±13,9	0,04
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	162,6±30,5	167,9±25,4	ns
Αδιπονεκτίνη (mg/l) (αριθμός ατόμων)	10,9±5,2 (66)	13,6±4,9 (12)	0,03



Σχήμα 1. Σχηματική παράσταση των διαφορών της απάντησης της γλυκόζης και της ινσουλίνης κατά την καμπύλη ανοχής γλυκόζης στους διάφορους γονότυπους των πολυμορφισμών 45T/G και 276G/T των γονιδίων της αδιπονεκτίνης



Σχήμα 2. Σχέση των επιπέδων αδιπονεκτίνης και των πολυμορφισμών 45T/G και 276G/T του γονιδίου της αδιπονεκτίνης στις γυναίκες με ΣΠΩ



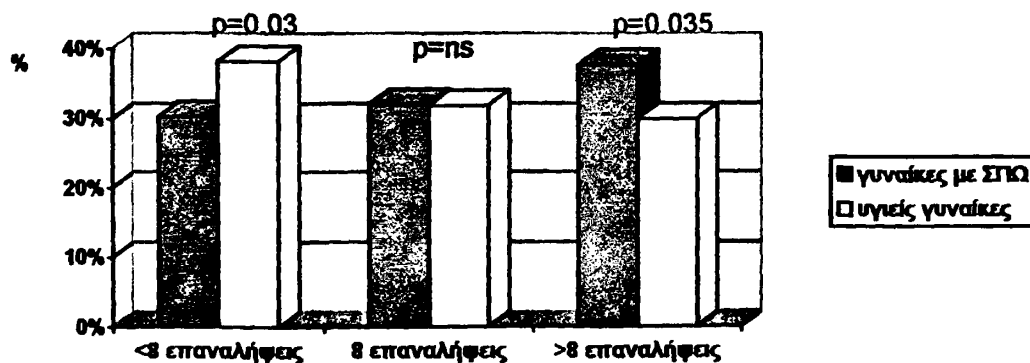
* Η διαφορά των επιπέδων αδιπονεκτίνης μεταξύ των γονοτύπων του πολυμορφισμού 276G/T του γονιδίου της αδιπονεκτίνης παρέμεινε στατιστικά σημαντική και μετά από προσαρμογή των τιμών ως προς την ηλικία το BMI και τα επίπεδα ινσουλίνης



Πολυμορφισμός (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG.

Ταυτοποιήθηκαν 6 αλληλόμορφα του γονιδίου της SHBG με 6-11 TAAAA επαναλήψεις αντίστοιχα. Η κατανομή των αλληλόμορφων διέφερε στις γυναίκες με ΣΠΩ και τις υγιείς γυναίκες. Πιο συγκεκριμένα, το 37,7% των γυναικών με ΣΠΩ είχε αλληλόμορφα με περισσότερες από 8 επαναλήψεις σε σχέση με το 30% των υγιών γυναικών που είχε αλληλόμορφα με τον ίδιο αριθμό επαναλήψεων [$p=0.03$, $OR=1,44(95\%CI=1,03-2,01)$]. Το 30,3% είχε αλληλόμορφα με μικρό αριθμό επαναλήψεων σε σχέση με το 38,2% των υγιών γυναικών [$p=0,035$, $OR=0,7(95\%CI=0,5-0,97)$], ενώ δεν διέφερε η συχνότητα του αλληλομόρφου με τις 8 επαναλήψεις στις δύο ομάδες μελέτης. Επομένως οι γυναίκες με ΣΠΩ έχουν πιο συχνά TAAAA αλληλόμορφα του γονιδίου της SHBG με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων σε αντίθεση με τις υγιείς γυναίκες που έχουν πιο συχνά TAAAA αλληλόμορφα με μικρό αριθμό επαναλήψεων (Σχήμα 3).

Σχήμα 3. Διαφορές στην κατανομή των (TAAAA)_n αλληλομόρφων του γονιδίου της SHBG ανάμεσα στις γυναίκες με ΣΠΩ και τις υγιείς γυναίκες.



Εκτός από την κατανομή των αλληλόμορφων και η κατανομή των γονότυπων του πολυμορφισμού (TAAAA)n του γονιδίου της SHBG είχε την ίδια χαρακτηριστική εικόνα. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συχνότητα γονότυπων με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων στις γυναίκες με ΣΠΩ σε σχέση με τις υγιείς γυναίκες (Σχήμα 4). Ως γονότυποι με μικρό αριθμό επαναλήψεων ορίστηκαν οι γονότυποι με 6/6, 6/7, 6/8, 7/7, 7/8 επαναλήψεις και ως γονότυποι με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων ορίστηκαν οι γονότυποι με 8/8, 8/9, 8/10, 8/11, 9/9, 9/10, 9/11, 10/10 επαναλήψεις.

Μελετήθηκε επίσης η συσχέτιση του πολυμορφισμού (TAAAA)n του γονιδίου της SHBG με τα επίπεδα της SHBG στον ορό των γυναικών με ΣΠΩ. Βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της SHBG μεταξύ των γυναικών με ΣΠΩ που είχαν αλληλόμορφα με 8 ή περισσότερες επαναλήψεις ($30,7 \pm 18,0 \text{ nmol/L}$) και στις ασθενείς με αλληλόμορφα με λιγότερες από 8 επαναλήψεις ($38,8 \pm 19,3 \text{ nmol/L}$, $p=0,005$). Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα FAI ανάμεσα σε αυτές τις δύο υποομάδες με την ομάδα των ασθενών που είχε το μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων να έχει και τα υψηλότερα επίπεδα FAI ($p=0,005$). Δεν υπήρχαν διαφορές όσον αφορά την ηλικία το BMI, το επίπεδο των ανδρογόνων το λόγο LH/FSH τους δείκτες αντίστασης και τη συγκέντρωση των λιπιδίων συγκρίνοντας τις ασθενείς με μικρό και μεγάλο αριθμό TAAAA επαναλήψεων (Πίνακας 8). Η συσχέτιση του αριθμού των επαναλήψεων του πολυμορφισμού (TAAAA)n του γονιδίου της SHBG και των επιπέδων SHBG στον ορό δεν επιβεβαιώθηκε στις υγιείς γυναίκες (Σχήμα 4)

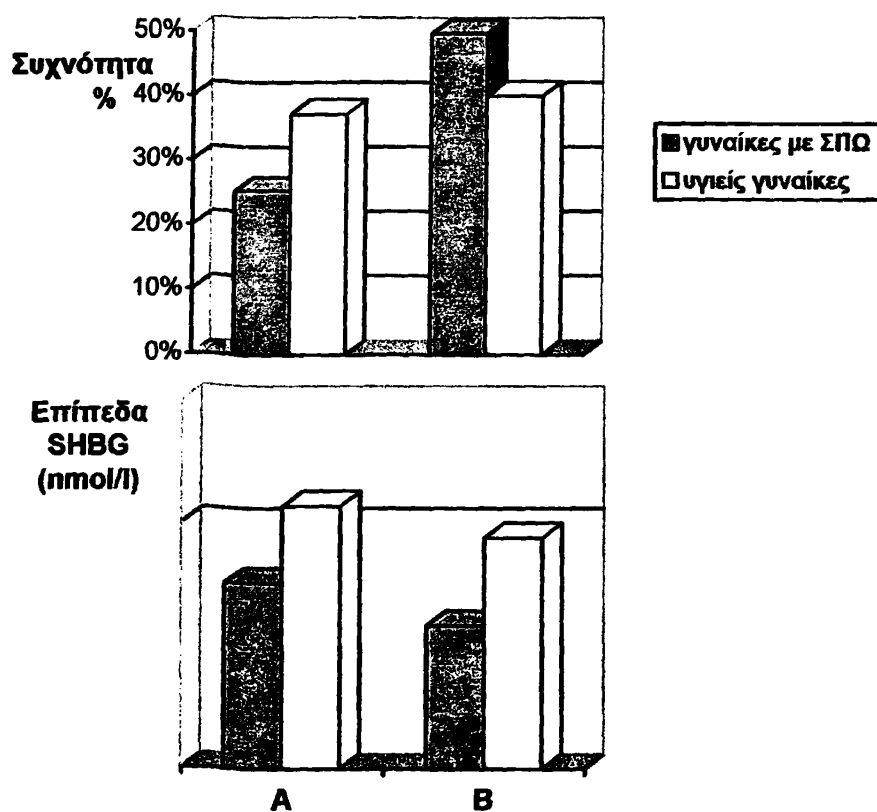


Πίνακας 8. Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των γυναικών με ΣΠΩ ανάλογα με τον αριθμό των ΤΑΑΑΑ επαναλήψεων. Ομάδα Α: ασθενείς με γονότυπους με μικρό αριθμό ΤΑΑΑΑ επαναλήψεων, ομάδα Β: ασθενείς με γονότυπους με μεγάλο αριθμό ΤΑΑΑΑ επαναλήψεων (ns: μη σημαντική διαφορά)

	Ομάδα Α	Ομάδα Β	p
Αριθμός ατόμων	50	87	
Ηλικία (έτη)	23,0±6,2	22,1±5,6	ns
BMI(Kg/m ²)	27,3±7,8	28,2±7,0	ns
LH/FSH	1,3±0,8	1,4±1,2	ns
SHBG (nmol/l)	38,8±19,3	30,7±18	0,005
Ολική τεστοστερόνη (nmol/l)	3,2±1,4	3,5±1,5	ns
FAI	10,5±7,8	16,3±13,8	0,005
Γλυκόζη/ινσουλίνη νηστείας	9,8±6,9	9,7±8,6	ns
HOMA	3,2±2,1	4,1±3,1	ns
AUCγλυκόζης (αριθμός ατόμων)	13645±2936 (20)	14931±3161(45)	ns
AUCινσουλίνης (αριθμός ατόμων)	9024±7842 (20)	11666±10823 (45)	ns
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	178±32,7	175±29,6	ns
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	79,5±47,3	79,3±34,6	ns
HDL-χοληστερόλη (mg/dl)	49,0±11,5	46,7±16,3	ns
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	162,2±28,2	159,1±28,5	ns



Σχήμα 4. Πάνω διάγραμμα: Σύγκριση της κατανομής των γονοτύπων του πολυμορφισμού του γονιδίου της SHBG, ομαδοποιημένων σε γονότυπους με μικρό και μεγάλο αριθμό TAAA επαναλήψεων, στις γυναίκες με ΣΠΩ και τις υγιείς γυναίκες ($p=0,009$). Κάτω διάγραμμα: συσχέτιση των γονοτύπων του πολυμορφισμού του γονιδίου της SHBG με τα επίπεδα της SHBG στον ορό. Οι ασθενείς με γονότυπους με μικρό αριθμό επαναλήψεων είχαν υψηλότερα επίπεδα SHBG σε σχέση με ασθενείς με γονότυπους με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων ($p=0,005$).



A: γυναίκες με γονότυπους με μικρό αριθμό TAAA επαναλήψεων
B: γυναίκες με γονότυπους με μεγάλο αριθμό TAAA επαναλήψεων

Διαφορές ανάμεσα σε υπέρβαρες-παχύσαρκες γυναίκες με ΣΠΩ και φυσιολογικού σωματικού βάρους ασθενείς.

Διακρίναμε τις γυναίκες με ΣΠΩ σε δύο ομάδες ανάλογα με το σωματικό βάρος.

Ομάδα 1: οι φυσιολογικού σωματικού βάρους γυναίκες με ΣΠΩ ($BMI < 25 \text{Kg/m}^2$, $n=77$ ασθενείς) και ομάδα 2 οι υπέρβαρες-παχύσαρκες γυναίκες με ΣΠΩ ($BMI \geq 25 \text{Kg/m}^2$, $n=103$ ασθενείς). Στον Πίνακα 9 φαίνονται οι κλινικές και βιοχημικές διαφορές αυτών των δύο ομάδων. Όπως είναι αναμενόμενο οι υπέρβαρες-παχύσαρκες ασθενείς έχουν υψηλότερους δείκτες αντίστασης στην ινσουλίνη, χαμηλότερα επίπεδα SHBG και μεγαλύτερου βαθμού υπερανδρογοναιμία όπως αυτή εκφράζεται με τα υψηλότερα επίπεδα FAI σε σύγκριση με τις φυσιολογικού σωματικού βάρους γυναίκες με ΣΠΩ. Όσον αφορά το λιπιδαιμικό προφίλ οι παχύσαρκες-υπέρβαρες γυναίκες έχουν υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χαμηλότερα επίπεδα HDL-χοληστερόλης ενώ τα επίπεδα της ολικής και LDL-χοληστερόλης δεν διαφέρουν στις δύο υποομάδες. Τέλος οι υπέρβαρες-παχύσαρκες ασθενείς είχαν μειωμένα επίπεδα αδιπνεκτίνης σε σύγκριση με τις φυσιολογικού σωματικού βάρους ασθενείς

Συγκρίνοντας αυτές τις δύο υποομάδες η κατανομή των γονοτύπων των πολυμορφισμών -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης και του 276G/T του γονιδίου της αδιπνεκτίνης διέφεραν σημαντικά ($p=0.02$ και $p=0.01$ αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά το γονίδιο της ρεζιστίνης ο γονότυπος CC και το αλληλόμορφο C βρέθηκαν συχνότερα στις υπέρβαρες-παχύσαρκες γυναίκες με ΣΠΩ ($p=0,01$, $OR=0,44$ $95\%CI=0,24-0,81$ και $p=0,01$, $OR=0,53$ $95\%CI=0,33-0,85$ αντίστοιχα) (Σχήμα 5).

Όσον αφορά τους πολυμορφισμούς του γονιδίου της αδιπνεκτίνης δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη κατανομή των συχνοτήτων των γονότυπων και των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού 45T/G ανάμεσα στις φυσιολογικού σωματικού βάρους και υπέρβαρες-παχύσαρκες γυναίκες με ΣΠΩ. Ωστόσο, στη θέση 276G/T του γονιδίου της αδιπνεκτίνης, ο γονότυπος TT ήταν λιγότερο συχνός στις υπέρβαρες-



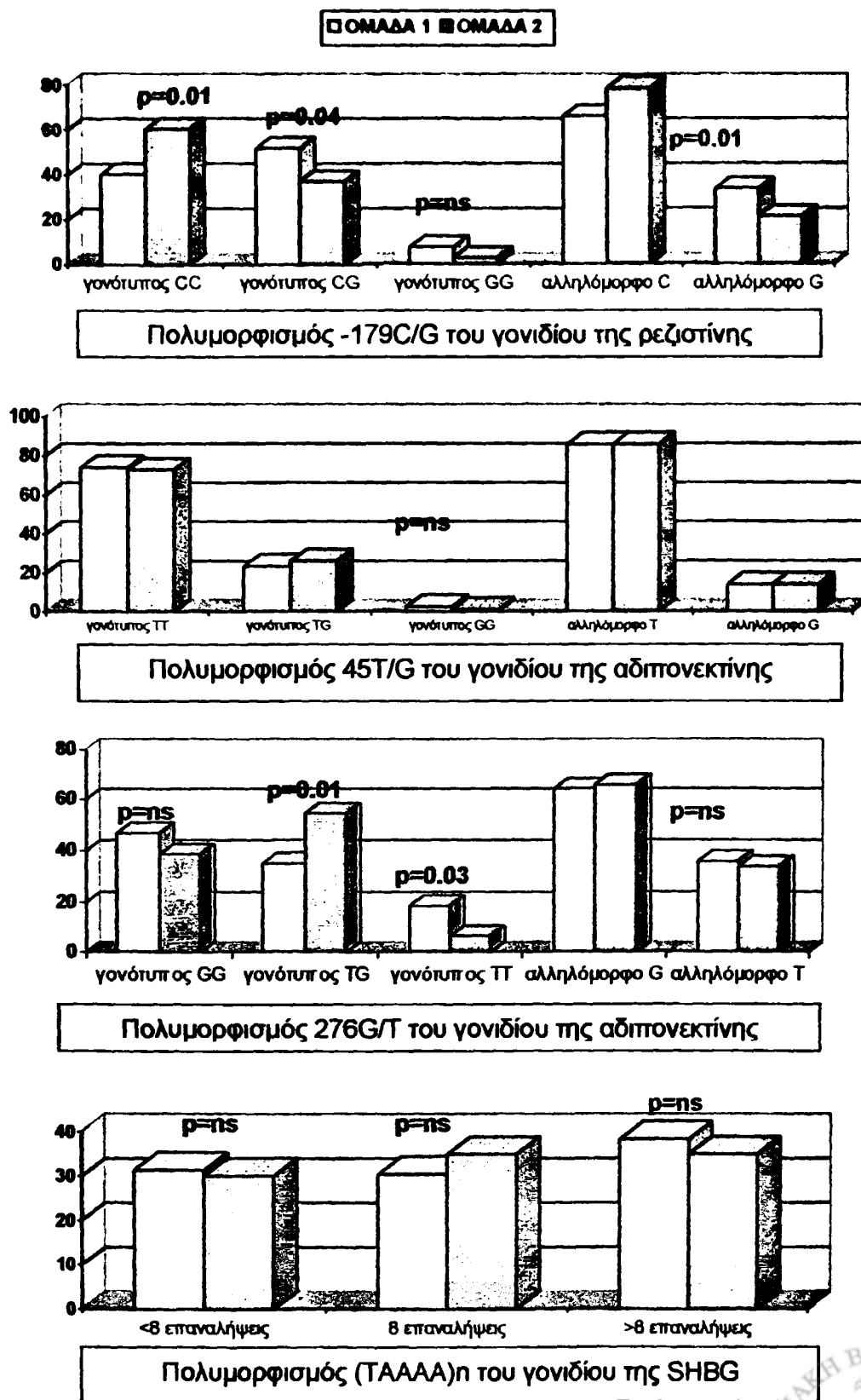
παχύσαρκες γυναίκες με ΣΠΩ ($p=0,03$, $OR=3,05$ $95\%CI=1,17-7,97$), και ο γονότυπος TG ήταν ο πιο συχνός σε αυτή την υποομάδα ($p=0,01$, $OR=0,45$ $95\%CI=0,25-0,83$). (Σχήμα 5).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των αλληλομόρφων και των γονότυπων του πολυμορφισμού (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG στις φυσιολογικού σωματικού βάρους και τις υπέρβαρες-παχύσαρκες ασθενείς (Σχήμα 5)

Πίνακας 9 Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικού σωματικού βάρους και των υπέρβαρων-παχύσαρκων γυναικών με ΣΠΩ . Ομάδα 1: οι φυσιολογικού σωματικού βάρους γυναίκες με ΣΠΩ ($BMI < 25 \text{Kg/m}^2$), Ομάδα 2: οι υπέρβαρες-παχύσαρκες γυναίκες με ΣΠΩ ($BMI \geq 25 \text{Kg/m}^2$). (ns=μη σημαντική διαφορά)

	Ομάδα 1	Ομάδα 2	p
Αριθμός ατόμων	77	103	
Ηλικία (έτη)	21,1±4,3	24,1±6,6	<0,001
BMI(Kg/m^2)	21,5±1,9	32,7±6,3	<0,001
LH/FSH	1,5±1,1	1,4±1,1	ns
SHBG (nmol/l)	43,9±26,6	32,1±24,1	0,003
Ολική τεστοστερόνη (nmol/l)	3,2±1,5	3,6±1,6	0,04
FAI	10,1±8,6	16,1±13,3	<0,001
Γλυκόζη/ινσουλίνη νηστείας	13,4±8,5	6,9±5,3	<0,001
HOMA	2,6±6,1	4,6±3,5	<0,001
AUCγλυκόζης (αριθμός ασθενών)	13320±2326	15556±3248	<0,001
AUCινσουλίνης (αριθμός ασθενών)	7267±3809 (33)	13384±11234	<0,001
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	175,3±29,3	183,5±35,3	ns
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	61,5±19,4	101,1±61,7	<0,001
HDL-χοληστερόλη (mg/dl)	52,2±10,2	44,0±15,0	0,001
LDL-χοληστερόλη (mg/dl)	163,0±28,3	163,3±31,2	ns
Αδιπονεκτίνη (mg/l) (αριθμός ασθενών)	12,7±4,7 (33)	10,2±5,5 (45)	0,004

Σχήμα 5. Κατανομή των γονότυπων και των αλληλόμορφων των πολυμορφισμών: - 179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης, 45T/G και 276G/T του γονιδίου της αδιπνεκτίνης και (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG στις φυσιολογικού σωματικού βάρους (Ομάδα 1) και τις υπέρβαρες-παχύσαρκες (Ομάδα 2) γυναίκες με ΣΠΩ.



8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη μελέτη διερευνήθηκε ο πιθανός ρόλος των γονιδίων της ρεζιστίνης, της αδιπνονεκτίνης και της SHBG στη παθογένεια του ΣΠΩ. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η σημασία τριών σημειακών πολυμορφισμών (του πολυμορφισμού -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης, και των πολυμορφισμών 45T/G και 276G/T του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης) και ενός VNTR πολυμορφισμού (του πολυμορφισμού (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG) στην ανάπτυξη του συνδρόμου και η πιθανή συσχέτιση τους με μεταβολικές παραμέτρους που χαρακτηρίζουν του ΣΠΩ.

Από αυτούς τους πολυμορφισμούς, μόνο ο πολυμορφισμός (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG βρέθηκε να συσχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης του ΣΠΩ. Αν και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη συχνότητα των πολυμορφισμών -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης, 45T/G και 276G/T του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης ανάμεσα στις γυναίκες με ΣΠΩ και τις υγιείς γυναίκες, διαπιστώθηκε η συσχέτιση αυτών των πολυμορφισμών με την ανάπτυξη της παχυσαρκίας στο ΣΠΩ και επιπλέον παρατηρήθηκε η σημασία των πολυμορφισμών του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης στην ανάπτυξη της αντίστασης στην ινσουλίνη.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG, βρέθηκε ότι οι γυναίκες με ΣΠΩ είχαν πιο συχνά αλληλόμορφα με μεγάλο αριθμό TAAAA επαναλήψεων (περισσότερες από 8 TAAAA επαναλήψεις) σε σχέση με τις υγιείς γυναίκες που είχαν σε μεγαλύτερη συχνότητα αλληλόμορφα με μικρό αριθμό TAAAA επαναλήψεων (λιγότερες από 8 TAAAA επαναλήψεις). Επιπλέον στις γυναίκες με ΣΠΩ, οι γονότυποι με τα μεγάλα μήκους TAAAA αλληλόμορφα συσχετίστηκαν με τα χαμηλότερα επίπεδα SHBG στον ορό και τα υψηλότερα επίπεδα FAI σε σχέση με τους γονότυπους με μικρού μήκους αλληλόμορφα. Επομένως φαίνεται ότι οι γυναίκες με ΣΠΩ έχουν πιο συχνά αλληλόμορφα με μεγάλο αριθμό TAAAA επαναλήψεων και αυτό συμβάλλει στα χαμηλότερα επίπεδα SHBG στον ορό τους.



Αυτή είναι η πρώτη μελέτη συσχέτισης που διερεύνησε τη σημασία πολυμορφισμού του γονιδίου της SHBG στην ανάπτυξη του ΣΠΩ και τη συσχέτισή του με τα επίπεδα SHBG στον ορό. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης είναι σημαντικά για δύο λόγους. Πρώτον, υποστηρίζουν την συμβολή γενετικών παραγόντων στα μειωμένα επίπεδα SHBG που χαρακτηρίζουν τις γυναίκες με ΣΠΩ επιπρόσθετα των ορμονικών, μεταβολικών και διατροφικών παραμέτρων που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τα επίπεδα της SHBG. (214-216). Έως τώρα ήταν γνωστό ότι οι γυναίκες με ΣΠΩ είχαν χαμηλά επίπεδα SHBG ως αποτέλεσμα της υπερανδρογοναιμίας και της υπερινσουλιναϊμίας που χαρακτηρίζουν το σύνδρομο (215,217). Εκτός από αυτούς τους φυσιολογικούς μηχανισμούς που επηρεάζουν τα επίπεδα της SHBG στις γυναίκες με ΣΠΩ, η παρούσα μελέτη υποστηρίζει τη πιθανότητα γενετικής βάσης που θα μπορούσε να εξηγήσει αυτό το χαρακτηριστικό του συνδρόμου.

Δεύτερον, οι γυναίκες που έχουν αλληλόμορφα που συσχετίζονται με χαμηλά επίπεδα SHBG, είναι εκτεθειμένες σε υψηλότερα από τα κανονικά επίπεδα ανδρογόνων σε ιστικό επίπεδο, κατάσταση που μπορεί να συμβαίνει ακόμα και κατά την ενδομήτριο ζωή. Αυτή η παρατήρηση, με τη σειρά της, έδωσε μια γενετική εξήγηση στην «εξελικτική θεωρία» (developmental origin hypothesis) για τη παθογένεια του ΣΠΩ, που πρόσφατα προτάθηκε από τους Abbott et al (93). Η θεωρία αυτή βασίστηκε στη μελέτη πειραματόζωων και σε κάποιες κλινικές παρατηρήσεις. Παρατηρήθηκε σε πειράματα σε θηλυκούς rhesus πιθήκους και θηλυκά πρόβατα, ότι αν με πειραματικές μεθόδους επάγει κάποιος την ανάπτυξη υπερανδρογοναιμίας κατά την ενδομήτριο ζωή, αυτό οδηγεί στην εμφάνιση κλινικών χαρακτηριστικών που μοιάζουν με την κλινική εικόνα του ΣΠΩ στην μετέπειτα ζωή. Έτσι κατά την ενήλικη ζωή, αυτά τα πειραματόζωα εμφανίζουν υπερέκκριση ωχρινοτρόπου ορμόνης, υπεραπάντηση της ωθητικής στεροειδογένεσης στην χοριακή γοναδοτροπίνη, όπως επίσης και διαταραχή της έκκρισης και δράσης της ινσουλίνης και χαρακτηρίζονται από υπερανδρογοναιμία, ανωοθυλακιορρηξία και



πολυκυστικές ωοθήκες(218-221). Επίσης κλινικές παρατηρήσεις υποστηρίζουν αυτή τη θεωρία των Abbott et al. Οι γυναίκες με έλλειψη 21-υδροξυλάσης, παρά το γεγονός ότι μετά τη γέννηση μπορεί να τα επίπεδα των επινεφριδικών ανδρογόνων να είναι φυσιολογικά, αναπτύσσουν χαρακτηριστικά φαινοτύπου ΣΠΩ. Ο ίδιος φαινότυπος παρατηρήθηκε και στις γυναίκες με συγγενείς εμβρυϊκούς ανδρογονο-παραγωγούς όγκους παρά την αφαίρεση του όγκου μετά τη γέννηση (222). Αυτές όλες οι παρατηρήσεις οδήγησαν στην υπόθεση ότι η έκθεση των θηλέων εμβρύων σε αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων κατά την ενδομήτρια ζωή μπορεί να οδηγήσει σε «προγραμματισμό» των ανθρώπινων συστημάτων να αναπτύξουν φαινότυπο ΣΠΩ κατά την ενήλικη ζωή (93).

Μολονότι δεν υπάρχουν άμεσα αποδεικτικά στοιχεία, μπορούμε να υποθέσουμε από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, ότι ο πολυμορφισμός (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG μπορεί να αποτελέσει το συνδετικό κρίκο με την εξελικτική θεωρία που περιγράφηκε. Επομένως, οι γυναίκες με ΣΠΩ έχουν πιο συχνά σε σχέση με τις υγιείς γυναίκες αλληλόμορφα του γονιδίου της SHBG με μεγάλο αριθμό TAAAA επαναλήψεων, τα οποία σχετίζονται με χαμηλότερα επίπεδα SHBG στον ορό και εμμέσως με αυξημένη έκθεση σε ανδρογόνα σε ιστικό επίπεδο καθόλη τη ζωή και ιδιαίτερα κατά την εμβρυϊκή ζωή όπου και γίνεται και ο «προγραμματισμός» της διαφοροποίησης των ιστών. Ωστόσο, αυτός ο μηχανισμός δεν αποτελεί τη μόνη εξήγηση για το πώς τα γενετικώς καθορισμένα χαμηλά επίπεδα της SHBG συμβάλλουν στην ανάπτυξη του ΣΠΩ. Μια άλλη εξήγηση είναι ότι τα χαμηλά επίπεδα SHBG μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη του ΣΠΩ συμβάλλοντας στα αυξημένα επίπεδα των βιολογικά δραστικών ανδρογόνων κατά την μεταεφηβική περίοδο.

Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας επιβεβαιώνουν τη λειτουργική σημασία του πολυμορφισμού (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG in vivo και συμφωνούν με τη μελέτη των Cousin et al που ακολούθησε (223). Και οι δύο μελέτες καταλήγουν στο



συμπέρασμα ότι τα αλληλόμορφα με μεγάλο αριθμό TAAA επαναλήψεων συσχετίζονται με χαμηλά επίπεδα SHBG στον ορό, πιθανότατα μέσω ελάττωσης της μεταγραφικής ικανότητας του γονιδίου SHBG, δεδομένου ότι δεν υπήρχαν διαφορές στις γυναίκες με ΣΠΩ με αλληλόμορφα με μεγάλο αριθμό TAAA επαναλήψεων και σε αυτές με μικρό αριθμό TAAA επαναλήψεων όσον αφορά το BMI ή άλλες βιοχημικές παραμέτρους που μπορεί να επηρεάζουν τα επίπεδα της SHBG. Αν και τα *in vitro* πειράματα είχαν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι το αλληλόμορφο με τις έξι επαναλήψεις έχει τη μικρότερη μεταγραφική ικανότητα, φαίνεται ότι *in vivo* η επίδραση του πολυμορφισμού (TAAA)_n στην έκφραση του γονιδίου SHBG επηρεάζεται από την κατάσταση υπερανδρογοναιμίας που παρατηρείται στο ΣΠΩ (213). Οι Hogeveen et al (213) ταυτοποίησαν έναν πυρηνικό παράγοντα που συνδέεται εκλεκτικά με το αλληλόμορφο του γονιδίου της SHBG με τις 6 TAAA επαναλήψεις και ελαττώνει τη μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου SHBG στις κυτταροκαλλιέργειες. Πιθανότατα *in vivo* αυτός ο παράγοντας να επηρεάζεται από τα αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων και να ρυθμίζει με διαφορετικό τρόπο τη μεταγραφή του γονιδίου (*allelic imbalance*, ανισορροπία αλληλομόρφων).

Η παρατήρηση ότι αλληλόμορφα του γονιδίου της SHBG μπορεί να συσχετίζονται με την ανάπτυξη υπερανδρογοναιμίας και ωθηκικής δυσλειτουργίας, είναι σε συμφωνία με τη πρόσφατη διαπίστωση των Hogeveen et al, οι οποίοι ταυτοποίησαν δύο σημειακούς πολυμορφισμούς σε περιοχή του γονιδίου της SHBG που κωδικοποιείται, ως υπεύθυνους για τα ασυνήθιστα χαμηλά επίπεδα SHBG σε μια γυναίκα με βαριά υπερανδρογοναιμία. Επιπλέον ο ένας από αυτούς τους σημειακούς πολυμορφισμούς συσχετίστηκε με υπερανδρογοναιμία και ωθηκική δυσλειτουργία με άλλες τέσσερις ασθενείς (224). Ωστόσο αυτός ο πολυμορφισμός είναι πολύ σπάνιος στις γυναίκες με ΣΠΩ.

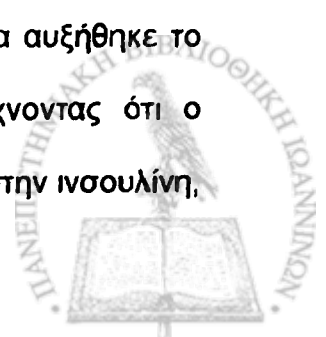
Όσον αφορά το γονίδιο της ρεζιστίνης, ο πολυμορφισμός -179C/G είναι ένας λειτουργικός πολυμορφισμός. Βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή και επηρεάζει



τη σύνδεση μεταγραφικών παραγόντων και, επομένως τα επίπεδα του mRNA της ρεζιστίνης (203). Σε άλλες μελέτες στο παρελθόν, ο πολυμορφισμός αυτός έχει επίσης συσχετιστεί με την παχυσαρκία αλλά και με δείκτες αντίστασης στην ινσουλίνη χωρίς όμως όλες οι μελέτες να συμφωνούν (225-227). Πρόσφατα, οι Smith et al (203) αν και δεν διαπίστωσαν διαφορετική συχνότητα αυτού πολυμορφισμού σε παχύσαρκα και φυσιολογικού σωματικού βάρους άτομα, υποστήριξαν ότι συσχετίζεται με δείκτες του οξειδωτικού stress, προτείνοντας έτσι έναν πιθανό μηχανισμό που θα μπορούσε να εξηγήσει τον τρόπο που η ρεζιστίνη εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της αντίστασης στην ινσουλίνη.

Στην παρούσα μελέτη αν και δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης με το ΣΠΩ *per se*, ωστόσο βρέθηκε μεγαλύτερη συχνότητα του αλληλομόρφου C στις παχύσαρκες ασθενείς και πιθανότατα το γονίδιο της ρεζιστίνης να συμβάλλει στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας στο ΣΠΩ. Αυτός ο πολυμορφισμός του γονιδίου της ρεζιστίνης έχει επίσης μελετηθεί σε γυναίκες με ΣΠΩ στις ΗΠΑ, στις οποίες όμως δε βρέθηκε να συσχετίζεται με το ΣΠΩ, αλλά ούτε και με την παχυσαρκία ή την αντίσταση στην ινσουλίνη (228). Αυτή η διαφορά με τη συγκεκριμένη μελέτη θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι αναφέρονται σε πληθυσμούς διαφορετικής εθνικότητας και είναι γνωστή η ετερογένεια του συνδρόμου και οι σημαντικές εθνικές και φυλετικές διαφοροποιήσεις ως προς τις κλινικές εκδηλώσεις του (229).

Πιο σημαντική φαίνεται να είναι η σημασία του γονιδίου της αδιπνεκτίνης στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη που χαρακτηρίζει το σύνδρομο. Πιο συγκεκριμένα, οι ομοζυγώτες TT ασθενείς για τον πολυμορφισμό 45T/G του γονιδίου της αδιπνεκτίνης φαίνεται ότι είχαν μικρότερα επίπεδα ινσουλίνης μετά από φόρτιση με γλυκόζη, ενώ τα επίπεδα στα οποία αυξήθηκε το σάκχαρο του αίματος δεν διέφεραν με βάση τον γονότυπο, δείχνοντας ότι ο γονότυπος αυτός πιθανότατα συσχετίζεται με μεγαλύτερη ευαισθησία στην ινσουλίνη,



ανεξάρτητη από τον παράγοντα παχυσαρκία. Επιπλέον αυτή η υποομάδα ασθενών είχε υψηλότερα επίπεδα αδιπονεκτίνης στον ορό σε σχέση με ασθενείς με το G αλληλόμορφο, αν και η διαφορά αυτή δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική, πιθανότατα λόγω του μικρού αριθμού των γυναικών με ΣΠΩ στις οποίες μετρήθηκαν τα επίπεδα αδιπονεκτίνης.

Επίσης οι γυναίκες με ΣΠΩ και γονότυπο GG ή GT στη θέση +276 ήταν πιο παχύσαρκες και με μεγαλύτερη αντίσταση στην ινσουλίνη από τις ομοζυγώτες TT ασθενείς για αυτόν τον πολυμορφισμό. Η παρουσία του G αλληλομόρφου του πολυμορφισμού 276G/T, είτε σε ομόζυγη είτε σε ετερόζυγη κατάσταση, συσχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα αδιπονεκτίνης ανεξαρτήτως ηλικίας, BMI και επιπέδων ινσουλίνης.

Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν τη πιθανότητα ύπαρξης συνδετικού κρίκου μεταξύ πολυμορφισμών του γονιδίου της αδιπονεκτίνης, μειωμένων επιπέδων αδιπονεκτίνης και μειωμένης ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Αν και αρχικά είχε υποθεθεί ότι η υποαδιπονεκτιναμία που συσχετίζεται με την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο είναι αποτέλεσμα αυτών των καταστάσεων, με αυτή τη μελέτη υποστηρίζεται ότι και γενετικοί παράγοντες μπορεί να ευθύνονται για τα χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης που συμβάλλουν στην αντίσταση στην ινσουλίνη που χαρακτηρίζει το ΣΠΩ. Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με πρόσφατη σάρωση του γονιδιώματος η οποία περιέγραψε δύο κύριους και τέσσερις πιθανούς γενετικούς τόπους που επηρεάζουν τη συγκέντρωση της αδιπονεκτίνης. Ένας από αυτούς τους τόπους έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 3 όπου βρίσκεται και το γονίδιο της αδιπονεκτίνης (230)

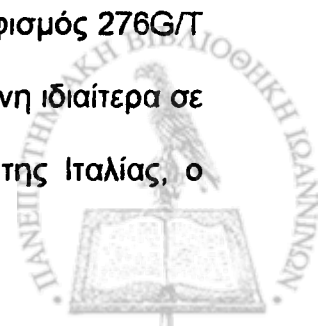
Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που θα μπορούσαν να εξηγήσουν τον τρόπο με το οποίο αυτοί οι δύο πολυμορφισμοί επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου της αδιπονεκτίνης ή τη βιολογική δράση του μορίου της αδιπονεκτίνης που συνδέεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη δεν είναι γνωστοί, μιας και ο πολυμορφισμός 45T/G



είναι συνώνυμη μεταλλαγή και ο 276G/T βρίσκεται στην περιοχή των ιντρονίων. Παρά όλα αυτά είναι πιθανό αυτοί οι πολυμορφισμοί να βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με κάποιο λειτουργικό πολυμορφισμό και με αυτό τον τρόπο να επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης ή την ικανότητα του μορίου της αδιπνονεκτίνης να πολυμερίζεται τροποποιώντας τη βιολογική δράση της (231).

Μολονότι οι πολυμορφισμοί 45T/G και 276G/T του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης είναι συνδεδεμένοι, σχετίζονται με διαφορετικά χαρακτηριστικά του ΣΠΩ. Ο πολυμορφισμός 45T/G συσχετίστηκε με την υπερινσουλιναίμια μετά από φόρτιση με γλυκόζη και όχι με τα επίπεδα παχυσαρκίας, ενώ ο πολυμορφισμός 276G/T βρέθηκε ότι συνδέεται με την παχυσαρκία αλλά και με την αντίσταση στην ινσουλίνη και τα επίπεδα αδιπνονεκτίνης. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο γεγονός ότι οι δύο πολυμορφισμοί προέκυψαν από διαφορετικές εξελικτικές διαδικασίες είτε γιατί βρίσκονται σε ισχυρή ή ασθενή σύνδεση με άλλα ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης. Από αυτούς τους δύο πολυμορφισμούς φαίνεται ότι ο 276G/T έχει τη σημαντικότερη επίδραση στο ΣΠΩ, μιας και συνδέεται άμεσα με τα επίπεδα αδιπνονεκτίνης στον ορό.

Παλιότερες μελέτες έχουν εξετάσει τη συσχέτιση αυτών των δύο αλλά και άλλων πολυμορφισμών του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και το μεταβολικό σύνδρομο. Έτσι, σε μελέτη στην Ιαπωνία, βρέθηκε ότι και οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί συσχετίζονται με την ανάπτυξη σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, κάτι που όμως δεν επιβεβαιώθηκε σε πληθυσμό διαβητικών ασθενών της Γαλλίας (204,232). Στην Γερμανία, οι Stumvoll et al (205) διαπίστωσαν τη συσχέτιση του πολυμορφισμού 45T/G του γονιδίου της αδιπνονεκτίνης με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την παχυσαρκία, ωστόσο αυτή η συσχέτιση παρατηρήθηκε μόνο σε άτομα χωρίς οικογενειακό ιστορικό σακχαρώδη διαβήτη. Ο πολυμορφισμός 276G/T βρέθηκε ότι συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για αντίσταση στην ινσουλίνη ιδιαίτερα σε αδύνατα άτομα (206). Επίσης σε πρόσφατη μελέτη, σε πληθυσμό της Ιταλίας, ο



συνδυασμός των δύο πολυμορφισμών συσχετίστηκε με τη παχυσαρκία και χαρακτηριστικά της αντίστασης στην ινσουλίνη (207). Ωστόσο υπήρξαν μελέτες που δε διαπίστωσαν καμία συσχέτιση αυτών των πολυμορφισμών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου (233,234).

Προσφάτως περιγράφηκε ότι γυναίκες με ΣΠΩ με γονότυπους TG και GG στη θέση +45 είχαν υψηλότερα επίπεδα Δ₄-ανδροστενεδιόνη (235). Αυτή η συσχέτιση του αλληλομόρφου G με την υπερανδρογοναιμία εξηγείται στην παρούσα μελέτη, μιας και το συγκεκριμένο αλληλόμορφο έχει συσχετιστεί με την υπερινσουλιναιμία, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την παραγωγή της Δ₄-ανδροστενεδιόνης σε αυτή την ομάδα γυναικών με ΣΠΩ.

Η γενετική βάση του ΣΠΩ είναι άγνωστη και πολλά γονίδια σε αλληλεπίδραση με περιβαλλοντικούς παράγοντες φαίνονται να εμπλέκονται στην παθογένεια του συνδρόμου. Μέχρι προσφάτως, ο πολυμορφισμός INS-VNTR του γονιδίου της ινσουλίνης είχε βρεθεί να έχει ισχυρή συσχέτιση με το ΣΠΩ (163,165). Η συγκεκριμένη μελέτη υποστηρίζει μια εξίσου ισχυρή συσχέτιση με το πολυμορφισμό (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG.

Επίσης αυτή η μελέτη δείχνει ότι γενετικές ποικιλίες του γονιδίου της ρεζιστίνης και της αδιπονεκτίνης θα μπορούσαν να εξηγήσουν το φαινότυπο της παχυσαρκίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη στο ΣΠΩ, υποστηρίζοντας τη συμμετοχή των δύο αυτών λιποκυτταροκινών στην παθογένεια αυτών των χαρακτηριστικών του συνδρόμου.

Τέλος αυτή η μελέτη έχει επιπρόσθετη σημασία. Δεδομένου ότι τόσο τα χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης όσο και SHBG αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες για την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και καρδιαγγειακής νόσου, δύο καταστάσεων που εμπλέκονται με την εξέλιξη του ΣΠΩ, οι πολυμορφισμοί αυτών των γονιδίων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση ασθενών με ΣΠΩ που βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο για αυτές τις νόσους (210,211,236,237).



9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Οι πολυμορφισμοί -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης και οι 45T/G και 276G/T του γονιδίου της αδιπονεκτίνης δεν συσχετίζονται με την ανάπτυξη του ΣΠΩ. Ωστόσο, διαπιστώθηκε η συσχέτιση αυτών των πολυμορφισμών με την ανάπτυξη της παχυσαρκίας στο ΣΠΩ και επιπλέον παρατηρήθηκε η σημασία των πολυμορφισμών του γονιδίου της αδιπονεκτίνης στην ανάπτυξη της αντίστασης στην ινσουλίνη και στα επίπεδα της αδιπονεκτίνης στο αίμα. Επομένως η ρεζιστίνη και η αδιπονεκτίνη συμβάλλουν στην ανάπτυξη του φαινοτύπου του ΣΠΩ και φαίνεται ότι εκτός της παχυσαρκίας και της αντίστασης στην ινσουλίνης και γενετικοί παράγοντες μπορεί να ευθύνονται για τα χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης.
- Ο πολυμορφισμός (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG συσχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης του ΣΠΩ. Οι γυναίκες με ΣΠΩ έχουν πιο συχνά αλληλόμορφα με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων (>8 TAAAA επαναλήψεις) σε σχέση με τις υγιείς γυναίκες. Οι ασθενείς με αλληλόμορφα με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων (>8TAAAA επαναλήψεις) έχουν χαμηλότερα επίπεδα SHBG σε σχέση με τις ασθενείς με αλληλόμορφα με μικρό αριθμό επαναλήψεων. Η συγκεκριμένη μελέτη παρέχει τη γενετική εξήγηση για την «εξελικτική θεωρία» του ΣΠΩ. Οι γυναίκες με αλληλόμορφα με μεγάλο αριθμό (TAAAA)_n επαναλήψεων έχουν χαμηλότερα επίπεδα SHBG και εκτείνονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ανδρογόνων σε ιστικό επίπεδο, καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους και ιδιαίτερα κατά την εμβρυϊκή ζωή, όπου γίνεται και ο «προγραμματισμός» για την ανάπτυξη φαινότυπου ΣΠΩ.



10. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (ΣΠΩ) αποτελεί την πιο συχνή ενδοκρινοπάθεια σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας και χαρακτηρίζεται από υπερανδρογοναιμία και χρόνια ανωοθυλακιορρηξία. Επιπλέον, σχετίζεται με μεταβολικές διαταραχές που εκδηλώνονται με κεντρική παχυσαρκία και αντίσταση στην ινσουλίνη.

Πρόκειται για μια οικογενή διαταραχή, αν και ο τύπος κληρονομικότητας παραμένει ασαφής, εξαιτίας της ετερογένειας του κλινικού φάσματος του συνδρόμου και της απουσίας χαρακτηριστικού αντρικού φαινότυπου. Φαίνεται όμως ότι περισσότερα από ένα γονίδια αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους, αλλά και με περιβαλλοντικούς παράγοντες, κυρίως διατροφικούς, παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη των κλινικών και μεταβολικών χαρακτηριστικών του συνδρόμου.

Ένα πλήθος υποψήφιων γονιδίων έχει μελετηθεί για τη πιθανή συσχέτιση με την ανάπτυξη του ΣΠΩ, τα οποία μπορούν να ομαδοποιηθούν σε πέντε κατηγορίες: γονίδια που εμπλέκονται στην έκκριση/δράση των γοναδοτροπινών, γονίδια που εμπλέκονται στην σύνθεση/δράση των ανδρογόνων, γονίδια που εμπλέκονται στην έκκριση/δράση της ινσουλίνης, γονίδια που εμπλέκονται στην ωοθυλακιογένεση και γονίδια που σχετίζονται με την παχυσαρκία και την ενεργειακή ομοιόσταση. Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η διερεύνηση της σημασίας πολυμορφισμών των γονιδίων της ρεζιστίνης, της αδιπονεκτίνης και της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης (SHBG) στο ΣΠΩ.

Μελετήθηκαν 180 γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας με ΣΠΩ και 140 υγιείς γυναίκες αντίστοιχης ηλικίας που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Οι ασθενείς εξετάστηκαν κατά την πρώιμη θυλακική φάση και έγινε βιοχημικός και ορμονικός έλεγχος. Καταγράφηκαν τα σωματομετρικά στοιχεία και υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (BMI). Υπολογίστηκε το ελεύθερο κλάσμα ανδρογόνων (FAI), ο λόγος γλυκόζης/ινσουλίνης νηστείας και ο δείκτης HOMA. Σε 100 ασθενείς έγινε από του



στόματος δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (75gr) και υπολογίστηκε η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC) για τη γλυκόζη και ινσουλίνη. Επιπλέον, σε 78 ασθενείς έγινε μέτρηση των επιπέδων αδιπονεκτίνης στο αίμα. Έγινε εξαγωγή DNA από περιφερικά λευκοκύτταρα και μελετήθηκαν ο πολυμορφισμός -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης, οι πολυμορφισμοί 45T/G και 276G/T του γονιδίου της αδιπονεκτίνης και ο πολυμορφισμός (TAAAA)n στον υποκινητή του γονιδίου της SHBG.

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην συχνότητα των πολυμορφισμών των γονιδίων της ρεζιστίνης και της αδιπονεκτίνης ανάμεσα στις γυναίκες με ΣΠΩ και την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, όσον αφορά τον πολυμορφισμό -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης, οι ασθενείς με γονότυπο CC είχαν υψηλότερο BMI σε σχέση με τις ασθενείς με γονότυπους CG και GG ($p=0,045$).

Επίσης οι TT ομοζυγώτες ασθενείς για τον πολυμορφισμό 45T/G του γονιδίου της αδιπονεκτίνης είχαν χαμηλότερα επίπεδα AUCινσουλίνης σε σχέση με τις ασθενείς με γονότυπους TG και GG ($p=0,045$) και η συσχέτιση του γονότυπου TT με μειωμένα επίπεδα υπερινσουλιναϊμίας παρέμεινε σημαντική και μετά από προσαρμογή ως προς την ηλικία, το BMI και τα επίπεδα της AUCγλυκόζης.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό 276G/T του γονιδίου της αδιπονεκτίνης, οι ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες ασθενείς για το G αλληλόμορφο (GG και GT) είχαν αυξημένο BMI ($p=0,01$), αυξημένα επίπεδα AUCγλυκόζης ($p=0,005$) και AUCινσουλίνης ($p=0,01$), υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($p=0,015$) και χαμηλότερα επίπεδα HDL-χοληστερόλης ($p=0,04$) σε σύγκριση με τις γυναίκες με ΣΠΩ που είχαν γονότυπο TT. Τα επίπεδα αδιπονεκτίνης του ορού ήταν σημαντικά χαμηλότερα στις ασθενείς με γονότυπο GG ή GT σε σχέση με τις TT ομοζυγώτες ασθενείς και αυτή η συσχέτιση παρέμεινε σημαντική και μετά από προσαρμογή ως προς την ηλικία, τα επίπεδα BMI και ινσουλίνης ($p=0,03$).

Η κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού (TAAAA)n του γονιδίου της SHBG διέφερε στις γυναίκες με ΣΠΩ και τις υγιείς γυναίκες. Οι ασθενείς με ΣΠΩ



είχαν πιο συχνά TAAAA αλληλόμορφα του γονιδίου της SHBG με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων (>8 TAAAA επαναλήψεις) σε αντίθεση με τις υγιείς γυναίκες που έχουν πιο συχνά TAAAA αλληλόμορφα με μικρό αριθμό επαναλήψεων (<8 TAAAA επαναλήψεις) ($p=0,03$). Επιπλέον οι γυναίκες με ΣΠΩ που είχαν αλληλόμορφα με 8 ή περισσότερες επαναλήψεις είχαν χαμηλότερα επίπεδα SHBG ($p=0,005$) και υψηλότερα επίπεδα FAI ($p=0,005$) σε σχέση με στις ασθενείς με αλληλόμορφα με λιγότερες από 8 επαναλήψεις και αυτή η συσχέτιση ήταν ανεξάρτητη από την ηλικία, το BMI και τους δείκτες αντίστασης στην ινσουλίνη.

Συμπερασματικά, οι πολυμορφισμοί -179C/G του γονιδίου της ρεζιστίνης και οι 45T/G και 276G/T του γονιδίου της αδιπονεκτίνης δεν συσχετίζονται με την ανάπτυξη του ΣΠΩ *per se*, αλλά επηρεάζουν τη φαινοτυπική έκφραση του ΣΠΩ. Ο πολυμορφισμός (TAAAA)_n του γονιδίου της SHBG συσχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης του ΣΠΩ. Οι γυναίκες με αλληλόμορφα με μεγάλο αριθμό (TAAAA)_n επαναλήψεων έχουν χαμηλότερα επίπεδα SHBG και εκτείνονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ανδρογόνων σε ιστικό επίπεδο, καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους και ιδιαίτερα κατά την εμβρυϊκή ζωή, όπου γίνεται και ο «προγραμματισμός» για την ανάπτυξη φαινότυπου ΣΠΩ.



11. SUMMARY

"The genetic basis of hyperandrogenic syndrome in women"

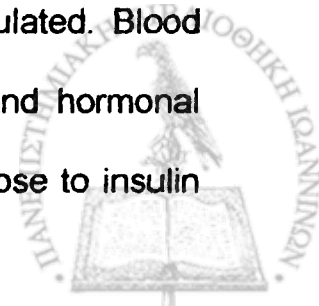
Nectaria Xita

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women of reproductive age characterized by anovulation and hyperandrogenism. It is also associated with metabolic aberrations manifested by central adiposity and insulin resistance.

The familial clustering of women with PCOS suggests a significant genetic component although the mode of inheritance has not been firmly established. Genetic studies face certain difficulties to perform arisen mainly from the heterogeneity of the syndrome and the absence of a known phenotype in male relatives. However, PCOS is considered to be an oligogenic trait in which the interaction of a number of genetic and environmental factors (notably dietary) seem to determine the typically heterogeneous, clinical and biochemical phenotype.

Several candidate genes have been proposed to contribute to susceptibility. Specifically, genes involved in gonadotropin secretion/action, genes related to androgenic pathways, genes associated with the regulation of insulin secretion/action, genes related to ovulatory function, as well as genes controlling body weight have been investigated. The aim of this study was to investigate whether polymorphisms in resistin gene, adiponectin gene and sex hormone-binding globulin gene (SHBG) are associated with PCOS.

The study population consisted of 180 Greek women with PCOS and 140 healthy women, as controls. All patients were studied in the early follicular phase. The body mass index (BMI) of each patient was calculated. Blood samples were drawn after overnight fasting for biochemical and hormonal measurements. The free androgen index (FAI), the fasting glucose to insulin



ratio and HOMA index were calculated. 100 patients underwent a 75gr oral glucose tolerance test (OGTT). The glucose and insulin responses to the OGTT were analyzed by calculating the area under the curve (AUC). Adiponectin levels were also measured in 78 women with PCOS. From both patients and controls whole blood samples were used for isolation of peripheral blood leucocytes for the genetic analysis. Resistin -179C/G polymorphism, adiponectin 45T/G and 276G/T polymorphisms and (TAAAA)n pentanucleotide repeat polymorphism in the promoter of SHBG were genotyped.

There was no statistically significant difference in the distribution of genotypes and alleles of resistin and adiponectin polymorphisms between PCOS subjects and normal controls. However, as regards the resistin -179C/G polymorphism, PCOS women with CC genotype had increased BMI compared to PCOS with CG and GG genotypes ($p=0.045$).

With regard to adiponectin 45T/G polymorphism, PCOS women with the TT genotype had significantly lower AUCinsulin levels compared to women with the TG and GG genotypes ($p=0.045$) and this association remained significant after adjustment for confounding factors, BMI, age and AUCglucose levels.

Regarding the adiponectin 276G/T polymorphism, patients homozygous and heterozygous for G allele (GG and GT) had higher BMI ($p=0.01$), AUCglucose ($p=0.005$) AUCinsulin ($p=0.01$) and triglyceride levels ($p=0.015$) and lower HDL-cholesterol ($p=0.04$) compared to those with the TT genotype. In addition, serum adiponectin levels were significantly lower in carriers of the GG or GT genotype than in TT homozygous women and the difference remained even after controlling for age, BMI and insulin levels ($p=0.03$).

A significant association was found between the (TAAAA)n polymorphism of SHBG gene and PCOS. Women with PCOS had a significantly greater frequency of longer (TAAAA)n alleles (>8 repeats) than normal women who had shorter alleles (<8



repeats) in higher frequency ($p=0.03$). Furthermore, in the PCOS group, carriers of the longer allele genotypes had lower SHBG levels ($p=0.005$) and higher FAI levels ($p=0.005$) than those with shorter alleles and this association was independent of age, BMI and insulin resistance indexes.

In conclusion, this study demonstrates that resistin and adiponectin genes do not appear to play a causative role in the development of PCOS per se, but polymorphisms of these genes may influence the phenotypic expression of PCOS. Instead, the (TAAAA) n polymorphism of SHBG gene was associated with increased risk for PCOS. Thus, the preferential expression of longer alleles in women with PCOS is associated with lower SHBG levels, and indirectly, with excess androgen exposure at the target tissue throughout life, but more importantly during fetal life when programming multiple organ systems that will later manifest the heterogeneous phenotype of PCOS.



12. Βιβλιογραφία

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409:860-921.
2. Wolfsberg TG, McEntyre J, Schuler GD. Guide to the draft human genome. *Nature* 2001, 409:824-826.
3. Claverie JM. Gene number. What if there are only 30,000 human genes? *Science* 2001, 291:1255-1257.
4. Mathe C, Sagot MF, Schiex T, et al. Current methods of gene prediction, their strengths and weaknesses. *Nucleic Acids Res* 2002, 30:4103-4117.
5. Thomson MW, McInnes RR, Willard HF. Ιατρική γενετική. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
6. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999, 283:1482-1488.
7. Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001, 2:21-32.
8. Robinson WP. Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays* 2000, 22:452-459.
9. Sinden RR. Biological implications of the DNA structures associated with disease causing triplet repeats. *Am J Hum Genet* 1999,64:346-353.
10. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine-a primer. *N Engl J Med* 2002, 347:1512-1520.
11. Polychronakos C. Genetic testing in clinical endocrinology. *Hormones* 2003, 2:201-210.
12. Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001, 291:1304-1351.



13. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998, 280:1077-1082.
14. Jeffreys Aj, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 1985, 314:67-73.
15. Seminara SB, Crowley WF. Genetic approaches to unraveling reproductive disorders: examples of bedside to bench research in the genomic era. *Endocr Rev* 2002, 23:382-392.
16. Risch N, Zhang H. Extreme discordant sib-pairs for mapping quantitative trait loci in humans. *Science* 1995, 268:1584-1589.
17. Cardon LR, Bell JL. Association study designs for complex diseases. *Nature* 2001, 2:91-99.
18. Gambaro G, Anglani F, D' Angelo A. Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet* 2000, 355:308-311.
19. Curtis D. Use of siblings in case-control association studies. *Ann Hum Genet* 1997, 61:319-333.
20. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993, 52:506-516.
21. Schulze TG, McMahon FJ. Genetic association mapping at the crossroads: which test and why? Overview and practical guidelines. *Am J Med Genet* 2002, 114:1-11.
22. Diamanti Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT et al. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: Hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84:4006-4011.



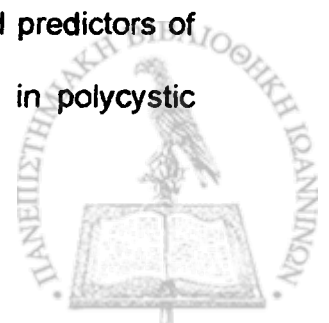
23. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, et al. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the south eastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:3078-3082.
24. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1935, 29:181-191.
25. Lobo RA. A disorder without identity "HCA", "PCO ", "PCOD", "PCOS", "SLS". What are we to call it? *Fertil Steril* 1995, 63:1158-1160.
26. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In *Polycystic ovary syndrome*, pp 377-384 Dunaif A, Givens JR, Haseltine F, Merriam GR, eds. Boston: Blackwell, 1992.
27. Carmina E, Lobo RA. Polycystic ovaries in hirsute women with normal menses. *Am J Med* 2001, 111:602-606
28. Goldzieher J, Green J. The polycystic ovary: I. Clinical and histologic features. *J Clin Endocrinol Metab* 1962, 22:325-338.
29. The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and longterm health risks related to polycystic ovary syndrome. (PCOS). *Hum Reprod* 2004, 19:41-47.
30. Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, et al. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2434-2438.
31. Carmina E, Koyama T, Chang L, et al. Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1807-1812.
32. Dunaif A, Sorbara L, Delson R et al. Ethnicity and polycystic ovary syndrome are associated with independent and additive decreases in insulin action in Caribbean-Hispanic women. *Diabetes* 1993; 42:1462-1468.



33. Williamson K, Gunn A, Johnson N et al. The impact of ethnicity on the presentation of polycystic ovarian syndrome. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 2001; 41:201-206.
34. Rosenfield RL. Current concepts of polycystic ovary syndrome. *Bailliere's Clin Obstet Gynaecol* 1997, 11:307-333.
35. Dunaif A, Graf M, Mandeli J et al. Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance, and/or hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1987, 65:499-507
36. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995, 333:853-861
37. Rosenfield RL, Ghai K, Ehrmann DA et al. Diagnosis of the polycystic ovary syndrome in adolescence: comparison of adolescent and adult hyperandrogenism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000, 13 Suppl 5,1285-1289
38. Elting MW, Korsen TJ, Rekers-Mombarg LT et al. Women with polycystic ovary syndrome gain regular menstrual cycles when ageing. *Hum Reprod* 2000, 15:24-28.
39. Winters SJ, Talbott E, Guzick DS, et al. Serum testosterone levels decrease in middle age in women with the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000, 73:724-729
40. Marshall JC, Eagleson CA. Neuroendocrine aspects of polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999, 28:295-324.
41. Morales AJ, Laughlin GA, Butzow T et al. Insulin, somatotropin and luteinizing hormone axis in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common and distinct features. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81:2854-2864.
42. Balen AH, Conway GS, Kaltsas G, et al. Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod* 1995, 10:2107-2111.



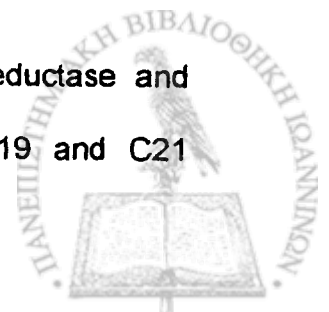
43. Conway GS, Honour JW, Jacombs HS. Heterogeneity of the polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine and ultrasound features in 556 patients. *Clin Endocrinol* 1989, 30:459-470
44. Wu F, Ames R, Evans MC, et al. Determinants of sex hormone-binding globulin in normal postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 2001, 54:81-87.
45. Holte J, Bergh T, Gennarelli G, Wide L. The independent effects of polycystic ovary syndrome and obesity on serum concentrations of gonadotrophins and sex steroids in premenopausal women. *Clin Endocrinol* 1994, 41:473-481
46. Turner EI, Watson MJ, Perry LA, White MC. Investigation of adrenal function in women with oligomenorrhoea and hirsutism (clinical PCOS) from the north-east of England using an adrenal stimulation test. *Clin Endocrinol* 1992, 36:389-397.
47. Sam S, Dunaif A. Polycystic ovary syndrome. Syndrome XX? *Trends Endocrinol Metab* 2003, 14:365-370.
48. Chang RJ, Nakamura RM, Judd HL et al. Insulin resistance in non-obese patients with polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metabol* 1983, 57:356-9
49. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989, 38:1165-1174
50. Dunaif A, Finegood DT. Beta-cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81:942-947.
51. Harris MI, Hadden WC, Knowler WC, Bennett PH. Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in US population aged 20-74 years. *Diabetes* 1987, 36:523-534.
52. Legro RS, Kusanman AR, Dodson WC, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic



- ovary syndrome: a prospective controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84:165-169
53. Wild RA, Alaupovic P, Parker U. Lipid and apolipoprotein abnormalities in hirsute women. I. The association with insulin resistance. *Am J Obstet Gynecol* 1992, 166:1191-1196
54. Conway GS, Agrawal R, Betteridge DJ et al. Risk factors for coronary artery disease in lean and obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1992, 37:119-125
55. Yildiz BO, Haznedaroglu IC, Kirazli S, Bayraktar M. Global fibrinolytic capacity is decreased in polycystic ovary syndrome, suggesting a prothrombotic state. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87:3871-3875.
56. Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, et al. Polycystic ovary syndrome and risk for myocardial infarction. Evaluated from a risk factor model based on a prospective population study of women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1992; 71:599-604.
57. Mather KJ, Kwan F, Corenblum B. Hyperinsulinemia in polycystic ovary syndrome correlates with increased cardiovascular risk independent of obesity. *Fertil Steril.* 2000, 73:150-156.
58. Balen AH, Laven JS, Tan SL, Dewailly D. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update* 2003, 9:505-514.
59. Polson DW, Adams J, Wadsworth J, et al. Polycystic ovaries- a common finding in normal women. *Lancet* 1988, 1:870-872
60. Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 2004, 60:1-17.



61. Waldstreicher J, Santoro NF, Hall LE, et al. Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metabol* 1988, 66:165-172.
62. Poretsky L, Cataldo N, Rosenwaks Z et al. The insulin related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* 1999, 20:535-582.
63. Levin JH, Carmina E, Lobo RA. Is the inappropriate gonadotropin secretion of patients with polycystic ovarian syndrome similar to that of patients with adult onset congenital adrenal hyperplasia? *Fertil Steril* 1991, 56:635-640.
64. Miller WL. Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Mol Cell Endocrinol* 2002, 198:7-14.
65. Hillier S, Tetsuka M. Role of androgens in follicle maturation and atresia. *Bailliere's Clin Obstet Gynaecol* 1997, 11:249-260
66. Rosenfield RL, Barnes RB, Cara JF et al. Dysregulation of cytochrome P450c17 α as a cause of polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril* 1990, 53:785-791.
67. Barnes RB, Rosenfield RL, Burstein S et al. Pituitary-ovarian responses to nafarelin testing in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1989;320:559-565.
68. Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW et al. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79:1158-1165
69. Ehrmann DA, Rosenfield RL, Barnes RB et al. Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. *N Engl J Med* 1992, 327:157-162
70. Stewart PM, Shackleton CH, Beastall GH, Edwards CR. 5 α -Reductase activity in polycystic ovary syndrome. *Lancet* 1990, 335:431-433.
71. Chin D, Shackleton CH, Prasad VK, et al. Increased 5 α -reductase and normal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase metabolism of C19 and C21



- steroids in a young population with polycystic ovarian syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000, 13:253-259.
72. Rodin A, Thakkar H Taylor N, Clayton R. Hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. Evidence of dysregulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *N Engl J Med* 1994, 330:460-465.
73. Conway GS, Avey C, Rumsby G. The tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is normal in women with hyperinsulinaemia and polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1994, 9:1681-1683
74. Talbot JA, Bicknell EJ, Ranjhowa M et al. Molecular scanning of the Insulin receptor gene in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol* 1996, 81:1979-1983.
75. Book CB, Dunaif A. Selective insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84:3110-3116.
76. Dunaif A, Xia J, Bool C. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and skeletal muscle: a potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 1995, 96:801-810
77. Zhang LH, Rodriguez H, Ohno S, Miller WL. Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarche and polycystic ovary syndrome. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995, 92:10619-10623.
78. Geffner ME, Kaplan SA, Bersch N, et al. Persistence of insulin resistance in polycystic ovarian disease after inhibition of ovarian steroid secretion. *Fertil Steril* 1986, 45:327-333
79. Dunaif A, Green G, Futterweit W, Dobrjansky A. Suppression of hyperandrogenism does not improve peripheral or hepatic insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, 70:699-704.



80. Diamanti-Kandarakis E, Mitrakou A, Hennes MM, et al. Insulin sensitivity and antiandrogenic therapy in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism: Clinical and Experimental* 1995, 44:525-531.
81. Nestler JE. Role of hyperinsulinemia in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome and its clinical implications. *Sem Reprod Endocrinol* 1997, 15:111-122
82. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS et al. Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1998, 338:1876-1880.
83. Elkind-Hirsch KE, Valdes CT, Malnak LR. Insulin resistance improves in hyperandrogenic women treated with Lupron. *Fertil Steril* 1993, 60:634-641.
84. Moghetti P, Tosi F, Castello R, et al. The insulin resistance in women with hyperandrogenism is partially reversed by antiandrogen treatment : evidence that androgens impair insulin action in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81:952-960
85. Nestler JE. Insulin regulation of human ovarian androgens. *Hum Reprod* 1997, 12(Suppl):53-62
86. Adashi EY, Hsueh AJ, Yen SS. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology*. 1981, 108:1441-1449.
87. Nestler JE, Jacobowicz DJ. Decreases in ovarian cytochrome P450c17-alpha activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1996, 335:617-623.
88. Moghetti P, Castello R, Negri C, et al. Insulin infusion amplifies 17 α -hydroxycorticosteroid intermediates response to adrenocorticotropin in hyperandrogenic women: apparent relative impairment of 17,20-lyase activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81:881-886



89. Nestler JE, Powers LP, Matt DW, et al. A direct effect of hyperinsulinaemia on serum sex-hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1991, 72:83-89.
90. Conover CA, Lee PDK, Kanaley JA, et al. Insulin regulation of insulin-like growth factor binding globulin-1 in obese and non obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1992, 74:1355-1357.
91. Bergh C, Carlsson B, Olsson JH et al. Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor 1 and insulin. *Fertil Steril* 1993, 59:323-327
92. Willis D, Mason H, Gilling-Smith C et al. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1996,81:302-309.
93. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome- a hypothesis. *J Endocrinol* 2002, 174:1-5.
94. Simpson JL. Molecular approaches to common causes of female infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002, 16:685-702.
95. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N et al. The genetic basis of infertility. *Reproduction* 2003, 126:13-25
96. Franks S, Gharani N, Waterworth D et al. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1997,12:2641-2648.
97. Kahsar-Miller M, Azziz R. The development of the polycystic ovary syndrome: family history as a risk factor. *Trends Endocrinol Metab* 1998, 9:55-58
98. Legro RS, Kuselman AR, Demers L et al. Elevated dehydroepiandrosterone sulfate levels as reproductive phenotype in brothers of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87:2134-2138



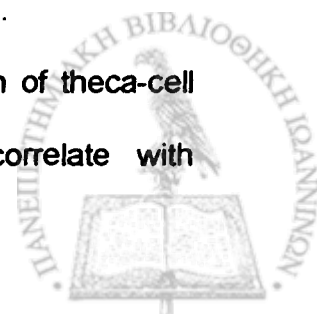
99. Kahsar-Miller MD, Nixon C, Boots LR et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. *Fertil Steril* 2001, 75:53-58
100. Legro RS, Driscoll D, Strauss III JF, et al. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Nat Acad USA* 1998, 95:14956-14960
101. Govind A, Obhrai MS, Clayton RN. Polycystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84:38-43
102. Ferriman D, Purdie A. The inheritance of PCO and possible relationship to premature balding. *Clin Endocrinol* 1979, 11:291-300.
103. Carey AH, Chan KL, Short F et al. Evidence for a single gene effect causing polycystic ovaries and male pattern baldness. *Clin. Endocrinol.* 1993, 38:653-658.
104. Hague WM, Adams J, Reeders ST et al. Familial polycystic ovaries; a genetic disease *Clin. Endocrinol* 1988, 29:593-605.
105. Jahanfar S, Eden JA, Warren P et al. A twin study of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1995, 63:478-486
106. Furui K, Suganuma N, Tsukahara S et al. Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) β -subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 78:107-113.
107. Nilsson C, Pettersson K, Millar R et al. Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. *Fertil Steril* 1997, 67:998-1004.



108. Haavisto A, Pettersson K, Bergendahl M et al. Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80:1257-1263.
109. Cramer DW, Petterson KSL, Barbieri RL, Huhtaniemi IT. Reproductive hormones, cancers and conditions in relation to a common genetic variant of luteinizing hormone, *Hum Reprod* 2000, 15:2103-2107
110. Tapanainen JS, Koivunen R, Fauser BC et al. A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84:1711-1715.
111. Rajkhowa M, Talbot JA, Jones PW, et al. Prevalence of an immunological LH β -subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1995, 43:297-303.
112. Ramanujam LN, Liao WX, Roy AC et al. Association of molecular variants of luteinizing hormone with menstrual disorders. *Clin Endocrinol* 1999, 51:243-246.
113. Elter K, Tamer Erel C, Cine N et al. Role of mutations Trp⁸→Arg and Ile¹⁵→Thr of the human luteinizing hormone β -subunit in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1999, 71:425-429.
114. Roy AC, Liao WX, Chen Y, et al. Identification of seven novel mutations in LH β -subunit by SSCP. *Mol Cell Biochem* 1996, 165:151-153.
115. Liao WX, Roy AC, Chan C et al. A new molecular variant of luteinizing hormone associated with female infertility. *Fertil Steril* 1998, 69:102-106.
116. Lamminen T, Jiang M, Manna PR, et al. Functional study of a recombinant form of human LH β -Subunit variant carrying the Gly¹⁰²Ser mutation found in Asian populations. *Mol Hum Reprod* 2002, 8:887-892.
117. Liao WX, Goh HH, Roy AC. Functional characterization of a natural variant of luteinizing hormone. *Hum Genet* 2002, 111:219-224.



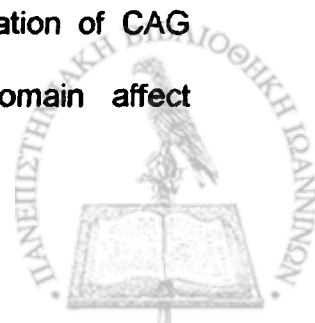
118. Rosenfield RL, Barnes RB, Ehrmann DA. Studies of the nature of 17-hydroxyprogesterone hyperresponsiveness to gonadotropin-releasing-hormone agonist challenge in functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79: 1686-1692.
119. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocri Rev* 1988, 9:295-318.
120. Jakimiouk AJ, Weitsman SR, Navab A, Magoffin DA. Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:1318-1323.
121. Carey AH, Waterworth D, Patel K et al. Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Hum Mol Genet* 1994, 3:1873-1876.
122. Diamanti-Kandarakis E, Bartzis MI, Zapanti ED, et al. Polymorphism T→C (-34bp) of gene CYP17 promoter in Greek patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1999, 71:431-435.
123. Gharani N, Waterworth DM, Williamson R et al. 5' Polymorphism of the CYP17 gene is not associated with serum testosterone levels in women with polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81:4174.
124. Techatraisak K, Conway GS, Rumsby G. Frequency of a polymorphism in the regulatory region of the 17 alpha-hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) gene in hyperandrogenic states. *Clin Endocrinol* 1997, 46:131-134.
125. Marszalek B, Lacinski M, Babych N, et al. Investigations on the genetic polymorphism in the region of CYP17 gene encoding 5'-UTR in patients with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2001, 15:123-128.
126. Daneshmand S, Weitsman SR, Navab A, et al. Overexpression of theca-cell messenger RNA in polycystic ovary syndrome does not correlate with



- polymorphisms in the cholesterol side-chain cleavage and 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase promoters. *Fertil Steril* 2002, 77:274-280.
127. Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, Quinn PG, McAllister JM. Increased cytochrome P450 17 α -hydroxylase promoter function in theca cells isolated from patients with polycystic ovary syndrome involves nuclear factor-1. *Mol Endocrinol* 2004, 18:588-605
128. Gharani N, Waterworth DM, Batty S et al. Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Hum Mol Genet* 1997, 6: 397-402.
129. Diamanti-Kandarakis E, Bartzis MI, Bergiele AT et al. Microsatellite polymorphism (tttta)_n at -528 base pairs of gene CYP11a influences hyperandrogenemia in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000, 73:735-741.
130. Urbanek M, Legro R, Driscoll D. et al. Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: Strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1999, 96:8573-8578.
131. San Millan JL, Sancho J, Calvo RM et al. Role of the pentanucleotide (tttta)_n polymorphism in the promoter of the CYP11a gene in the pathogenesis of hirsutism. *Fertil Steril* 2001, 75: 797-802.
132. Gaasenbeek M, Powell BL, Sovio U et al. Large-scale analysis of the relationship between CYP11a promoter variation, polycystic ovarian syndrome and serum testosterone, *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:2408-2413.
133. Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M et al The P450 gene superfamily: recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA* 1989, 8:1-13.
134. Harada N, Ogawa H, Shozu M et al. Genetic studies to characterize the origin of the mutation in placental aromatase deficiency. *Am J Hum Genet* 1992, 52: 666-672.



135. Ito Y, Fisher CR, Conte FA et al. Molecular basis of aromatase deficiency in an adult female with sexual infantilism and polycystic ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:11673-11677.
136. Takayama K, Fukaya T, Sasano H et al. Immunohistochemical study of steroidogenesis and proliferation in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 1996, 11:1387-1392.
137. Tucci S, Futterweit W, Conception ES et al. Evidence of association of polycystic ovary syndrome in Caucasian women with marker at the insulin receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:446-449.
138. Mason HD, Willis DS, Beard RW et al. Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: relationship to menstrual cycle and concentrations of gonadotropins and sex steroids in follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79:1355-1360.
139. Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM et al. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization on the X chromosome. *Science* 1988, 240:327-330.
140. Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB et al. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 1989, 44:264-269.
141. Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. Steroid receptor family: structure and function. *Endocr Rev* 1990, 11:201-220.
142. Edwards A, Hammond HA, Jin L et al. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992, 12:241-253.
143. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucl Acids Res* 1994, 22:3181-3186.



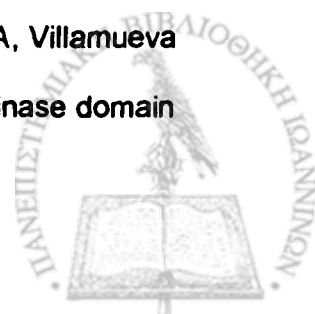
144. Ashley CT, Warren ST. Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annu Rev Genet* 1995, 29:703-728.
145. LaSpada AR, Wilson EM, Lubahn DB et al. Androgen receptor gene mutations in x-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991, 352:77-79.
146. Giovannucci E, Stamfer MJ, Krithivas K et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997, 94:3320-3323.
147. Dowsing AT, Yong EL, McLachlan RI et al. Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen receptor gene. *Lancet* 1999, 354: 640-643.
148. Legro RS, Shahbarami B, Lobo RA et al. Size polymorphisms of the androgen receptor among female Hispanics and correlation with androgenic characteristics. *Obstet Gynecol* 1994, 83:701-706.
149. Sawaya ME, Shalita AR. Androgen receptor polymorphisms (CAG repeat lengths) in androgenetic alopecia, hirsutism and acne. *J Cut Med Surg* 1998, 3:9-15.
150. Misfud A, Ramirez S, Yong EL. Androgen receptor gene CAG trinucleotide repeats in anovulatory infertility and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85: 3484-3488.
151. Vottero A, Stratakis CA, Ghizzoni L et al. Androgen receptor-mediated hypersensitivity to androgens in women with nonhyperandrogenic hirsutism: skewing of X-chromosome inactivation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84:1091-1095.
152. Hickey T, Chandy A, Norman RJ. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and X-chromosome inactivation in Australian Caucasian women with infertility related to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87:161-165.



153. Calvo RM, Asuncion M, Sancho J, et al. The role of the CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene and of skewed X-chromosome inactivation in the pathogenesis of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:1735-1740.
154. Holte J, Bergh T, Berne C. Restored insulin sensitivity but persistent increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80:2586-2593.
155. Junien C, Van Heyningen V. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 11. *Cytogenetics and Cell Genetics* 1990, 55:153-169.
156. Bell GI, Selby MJ, Rutter WJ. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature* 1982, 295:31-35.
157. Paquette J, Giannoukakis N, Polychronakos C et al. The INS 5' variable number of tandem repeats is associated with IGF2 expression in humans. *J Biol Chem* 1998, 273:14158-14164.
158. Kennedy G, German MS, Rutter WJ. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nat Genet* 1995, 9:293-298.
159. Weaver JU, Kopelman PG, Hitman GA. Central obesity and hyperinsulinaemia in women are associated with polymorphism in the 5' flanking region of the human insulin gene. *Eur J Clin Invest* 1992, 22:265-270.
160. Jowett NI, Williams LG, Hitman GA et al. Diabetic hypertriglyceridaemia and related 5' flanking polymorphisms of insulin gene. *Br Med J* 1984, 288:96-99.
161. Ong KL, Phillips DI, Fall C et al. The insulin gene VNTR, type 2 diabetes and birth weight. *Nat Genet* 1999, 21:262-263.



162. Bennett ST, Todd JA. Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. *Ann Rev Genet* 1996, 30:343-370.
163. Waterworth DM, Bennett ST, Gharani N et al. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet* 1997, 349:986-990.
164. Robinson S, Kiddy D, Gelding SV. The relationship of insulin sensitivity to menstrual pattern in women with hyperandrogenism and polycystic ovaries. *Clin Endocrinol* 1993, 39:351-355.
165. Bennett ST, Todd JA, Waterworth DM et al. Association of insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet* 1997, 349:1771-1772.
166. Eaves IA, Bennett ST, Forster P et al. Transmission ratio distortion at the INS-IGF2 VNTR. *Nat Genet* 1999, 22:324-325.
167. Michelmore K, Ong K, Mason S et al. Clinical features in women with polycystic ovaries: relationships to insulin sensitivity, insulin gene VNTR and birth weight. *Clin Endocrinol* 2001, 55:439-446.
168. Calvo RM, Telleria D, Sancho J et al. Insulin gene variable number of tandem repeats regulatory polymorphism is not associated with hyperandrogenism in Spanish girls. *Fertil Steril* 2002, 77:666-668
169. Vankova M, Vrbikova J, Hill M, et al. Association of insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Ann NY Acad Sci* 2002, 967:558-565.
170. Goldfine ID. The insulin receptor: molecular biology and transmembrane signaling. *Endocr Rev* 1987, 8:235-255.
171. Krook A, Kumar S, Laing I et al. Molecular scanning of the insulin receptor gene in syndromes of insulin resistance. *Diabetes* 1994, 43:357-368.
172. Siegel S, Futterweit W, Davies TF, Concepcion ES, Greenberg DA, Villamueva R, Tomer Y. A C/T single nucleotide polymorphism at the tyrosine kinase domain



- of the insulin receptor gene is associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2002, 78:1240-1243.
173. Villuendas G, Escobar-Morreale HF, Tosi F et al. Association between the D19S884 marker in the insulin receptor gene locus and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003, 79:219-220
174. El Mkadem SA, Lautier C, Marcari F et al. Role of allelic variants Gly972Arg of IRS-1 and Gly1057Asp of IRS-2 in moderate-to-severe insulin resistance of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 2001, 50:2164-2168.
175. Ehrmann DA, Tang X, Yoshiuchi I et al. Relationship of insulin receptor substrates-1 and -2 genotypes to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87:4297-4300
176. Burks DJ, White MF. IRS proteins and b-cell function. *Diabetes* 2001, 50(Suppl):S140-S145.
177. Porzio O, Federici M, Hribal ML et al. The Gly972Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Clin Invest* 1999, 104:357-364.
178. Hribal ML, Federici M, Porzio O et al. The Gly→Arg⁹⁷² amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:2004-2013
179. Shimonaka M, Inouye S, Shimasaki S et al. Follistatin binds to both activin and inhibin through the common beta-subunit. *Endocrinology* 1991, 128:3313-3315.
180. Mather JP, Moore A, Li RH. Activins, inhibins and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997, 215:209-222.
181. Shibata H, Kanzaki M, Takeuchi T et al. Two distinct signaling pathways activated by activin A in glucose responsive pancreatic beta-cells lines. *J Mol Endocrinol* 1996, 16:249-258.



182. Guo Q, Kumar TR, Woodruff T et al. Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 1998, 12:96-106.
183. Urbanek M, Wu X, Vickery KR et al. Allelic variants of the Follistatin Gene in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:4455-4461.
184. Calvo RM, Villuedas G, Sancho J et al. Role of the follistatin gene in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001, 75:1020-1023.
185. Liao WX, Roy AC, Ng SC. Preliminary investigation of follistatin gene mutations in women with polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod* 1999, 6:587-590
186. Fujiwara T, Sidis Y, Welt C et al. Dynamics of inhibin subunit and follistatin mRNA during development of normal and polycystic ovary syndrome follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:4206-4215
187. Erickson GF, Chung DG, Sit A et al. Follistatin concentrations in follicular fluid of normal and polycystic ovaries. *Hum Reprod* 1995, 10:2120-2124.
188. Norman RJ, Milner CR, Groome NP et al. Circulating follistatin concentrations are higher and activin concentrations are lower in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2001, 16:668-672
189. Eldar-Geva T, Spitz IM, Groome NP et al. Follistatin and activin A serum concentrations in obese and non-obese patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2001, 16:2552-2556
190. Xita N, Georgiou I, Tsatsoulis A. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2002, 147:717-725.
191. Legro RS, Strauss IIIJF. Molecular progress in infertility: polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2002, 78:569-576.
192. San Millan JL, Corton M, Villuendas G, et al. Association of the polycystic ovary syndrome with genomic variants related to insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:2640-2646.



193. Zhang Y, Proenca R, Maffei M et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994, 377:527-529.
194. Asima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trend Endocrinol Metab* 2000, 11:327-332.
195. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001, 409:307-312.
196. Arita Y, Kihara S, Ouchi N et al Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 257:79-83.
197. Hotta K, Funahashi T Arita Y et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20:1595-1599.
198. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001, 7:941-946.
199. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001, 50:2094-2099.
200. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002, 8:731-737.
201. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 2002, 277:25863-25866.
202. Kissebach AH, Sonnenberg GE, Myklebust J et al. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:14478-14483
203. Smith SR, Bai F, Charbonneau C et al. A promoter genotype and oxidative stress potentially link resistin to human insulin resistance. *Diabetes* 2003, 52:1611-1618.



204. Hara K, Boutin P, Mori Y, et al. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 2002, 51:536-540
205. Stumvoll M, Tschrirter O, Fritsche A, et al. Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon2) with obesity and insulin sensitivity. Interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002, 51:37-41
206. Filippi E, Sentinelli F, Trischitta V, et al. Association of the human adiponectin gene and insulin resistance. *Eur J Hum Genet* 2004, 12:199-205.
207. Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, et al. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2002, 51:2306-2312.
208. Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, et al. The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res* 1982, 38:457-510.
209. Holte J, Bergh T, Gennarelli G, Wide L. The independent effects of polycystic ovary syndrome and obesity on serum concentrations of gonadotrophins and sex steroids in premenopausal women. *Clin Endocrinol* 1994, 41:473-481
210. Lindstedt G, Lundberg PA, Lapidus L, et al. Low sex-hormone-binding globulin concentration as independent risk factor for development of NIDDM. 12-year follow up of population study of women in Gothenborg, Sweden. *Diabetes* 1991, 40:123-128.
211. Lapidus L, Lindstedt G, Lundberg PA, et al. Concentrations of sex-hormone-binding-globulin and corticosteroid binding globulin in serum in relation to cardiovascular risk factors and to 12-year incidence of cardiovascular disease and overall mortality in postmenopausal women. *Clin Chem* 1986, 32:146-152.



212. Berube D, Seralini GE, Gagne R, Hammond GL. Localization of human sex hormone-binding gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-p13). *Cytogenet Cell Genet* 1990, 54:65-67.
213. Hogeveen KN, Talikka M, Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin promoter activity is influenced by a (TAAA)_n repeat element within an Alu sequence. *J Biol Chem* 2001, 276:36383-36390.
214. Von Schoultz B, Carlstrom K. On the regulation of sex hormone-binding globulin: a challenge of an old dogma and outlines of an alternative mechanism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1989, 32:327-334.
215. Toscano V, Balducci R, Bianchi P, et al. Steroidal and non-steroidal factors in plasma sex hormone-binding globulin regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992, 43:431-437.
216. Plymate SR, Hoop RC, Jones RE, Matej LA. Regulation of sex hormone-binding globulin production by growth factors. *Metabolism* 1990, 39:967-970.
217. Nestler JE, Powers LP, Matt DW, et al. A direct effect of hyperinsulinaemia on serum sex-hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1991, 72:83-89.
218. Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, et al. Insights into the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies of prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Trends Endocrinol Metab* 1998, 9:62-67.
219. Eisner JR, Barnett MA, Dumesic DA, Abbott DH. Ovarian hyperandrogenism in adult female rhesus monkeys exposed to prenatal androgen excess. *Fertil Steril* 2002, 77:167-172.
220. Eisner JR, Dumesic DA, Kemnitz JW, Abbott DH. Timing of prenatal androgen excess determines differential impairment in insulin secretion and action in adult female rhesus monkeys. *J Clin. Endocrinol. Metabolism* 2000, 85:1206-1210.



221. Padmanabhan V, Evans N, Taylor JA, Robinson JE. Prenatal exposure to androgens leads to the development of cystic ovaries in the sheep. *Biol Reprod* 1998, 56 (Suppl 1):194.
222. Bames RB, Rosenfield RL, Erhmann DA, et al. Ovarian hyperandrogenism as a result of congenital adrenal virilizing disorders: evidence for perinatal masculinization of neuroendocrine function in women. *J Clin. Endocrinol. Metabolism* 1994, 79:1328-1333.
223. Cousin P, Calemard-Michel I, Lejeune H, et al Influence of SHBG gene pentanucleotide TAAA repeat and D327N polymorfism on serum sex hormone-binding globulin concentrations in hirsute women, *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:917-924
224. Hogeveen KN, Cousin P, Pugeat M, et al. Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction. *J. Clin. Invest* 2002, 109:973-981.
225. Engert JC, Vohl MC, Williams SM et al. 5' Flanking variants of resistin are associated with obesity. *Diabetes* 2002, 51:1629-1634.
226. Wang H, Chu WS, Hemphill C, Elbein SC. Human resistin gene: Molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians *J Clin. Endocrinol. Metabol.* 2002, 87:2520-2524.
227. Ma X, Warram JH, Trischitta V, Doria A. Genetic variants at the resistin locus and the risk of type 2 diabetes in caucasians. *J Clin. Endocrinol. Metabol* 2002; 87:4407-10.
228. Urbanek M, Du V, Silander K et al. Variation in resistin gene promoter not associated with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 2003, 52:214-217.
229. Carmina E, Legro RS, Stamets K et al. Difference in body-weight between American and Italian women with polycystic ovary syndrome: influence of the diet. *Hum Reprod* 2003,11:2289-2293.



230. Comuzzie AG, Funahashi T, Sonnenberg G, et al. The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:4321-4325.
231. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 2003, 278:40352-40363.
232. Vasseur F, Helbecque N, Dina C et al. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet* 2002, 11:2607-2614.
233. Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, et al. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obesity* 2000, 24:861-868.
234. Gu HF, Abulaiti A, Ostenson CG, et al. Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of the adiponectin (APM1) gene are associated with type 2 diabetes in Swedish Caucasians. *Diabetes* 2004, 53(Suppl 1):S31-S35
235. Panidis D, Kourtis A, Kukuvtis A, Farmakiotis D, Xita N, Georgiou I, Tsatsoulis A. Association of the T45G polymorphism in exon 2 of the adiponectin gene with polycystic ovary syndrome: role of Δ^4 -androstenedione. *Hum Reprod* 2004, 19:1728-1733.
236. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003, 361:226-228.
237. Nakamura Y, Shimada K, Fukuda D, et al. Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease. *Heart* 2004, 90:528-533.

