Varijacije odabranih gena u bolesnica sa sindromom policističnih jajnika

Škrgatić, Lana

Doctoral thesis / Disertacija

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:344124

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository



Središnja medicinska knjižnica

Škrgatić, Lana (2011) ***Varijacije odabranih gena u bolesnica sa sindromom policističnih jajnika [Polymorphisms of selected genes in polycystic ovary syndrome].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/1415

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lana Škrgatić

Varijacije odabranih gena u bolesnica sa sindromom policističnih jajnika

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

UNIVERSITY OF ZAGREB
SCHOOL OF MEDICINE

Lana Škrgatić

Polymorphisms of selected genes in polycystic ovary syndrome

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2011.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lana Škrgatić

Varijacije odabranih gena u bolesnica sa sindromom policističnih jajnika

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Disertacija je izrađena u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničkoga bolničkog centra i Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu projekta "Etiologija i patogeneza PCOS-a – odabir terapije i metaboličke posljedice" Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa br. 108-0000000-0388. Molekularnogenetičke analize provedene su u Zavodu za genetiku Klinike za ginekologiju i opstetriciju Sveučilišnoga medicinskog centra u Ljubljani, Slovenija (Institute of Medical Genetics, Department of Obstetrics and Gynecology, University Medical Center Ljubljana, Slovenia).

Voditeljice rada su doc. dr. sc. Dinka Pavičić Baldani iz Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a i Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i prof. dr. sc. Ksenija Geršak iz Klinike za ginekologiju i opstetriciju Sveučilišnoga medicinskog centra u Ljubljani, Slovenija (Department of Obstetrics and Gynecology, University Medical Center Ljubljana, Slovenia).

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Dinki Pavičić Baldani na velikom trudu i požrtvovnosti koja je bila potrebna da se provede ovo istraživanje. Hvala na strpljenju, toploj podršci i nesebičnoj pomoći u svim fazama izrade ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Kseniji Geršak na pruženoj mogućnosti boravka u njezinom laboratoriju kao i na velikoj podršci i vrijednim savjetima tijekom pisanja rada.

Zahvaljujem se dragim kolegicama dr. sc. Jasmini Živi Černe i doc. dr. sc. Polonci Ferk na velikom trudu i pomoći oko laboratorijskog dijela istraživanja.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Velimiru Šimuniću što me uveo u svijet ginekološke endokrinologije. Njegov entuzijazam i ljubav prema struci je zarazan i nadasve dragocjen dar.

Veliko hvala dr. sc. Zvonku Kostanjčaru za pomoć pri statističkoj obradbi podataka.

Rad posvećujem svojoj obitelji uz čiju je ljubav i potporu sve moguće.

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
1.1. Incidencija ... 1
1.2. Predispozicija za PCOS ... 1
1.3. Dijagnostički kriteriji ... 1
1.3.1. NIH-kriteriji ... 2
1.3.2. ESHRE/ASRM (Rotterdamski) kriteriji ... 2
1.3.3. AES-kriteriji ... 2
1.4. Dijagnoza PCOS-a ... 3
1.4.1. Dijagnostika glavnih značajki PCOS-a ... 3
1.4.1.1. Klinički hiperandrogenizam i/ili biokemijska hiperandrogenemija ... 3
1.4.1.2. Poremećaji menstruacijskoga ciklusa – oligo/anovulacije ... 5
1.4.1.3. Ultrazvučni nalaz policističnih jajnika ... 5
1.4.1.4. Isključivanje ostalih hiperandrogenih stanja ili poremećaja ovulacije ... 5
1.4.1.5. Dijagnostika metaboličkih poremećaja povezanih s PCOS-om ... 6
1.5. Patofiziologija sindroma policističnih jajnika ... 7
1.5.1. Poremećaj funkcije jajnika ... 7
1.5.1.1. Pojačana biosinteza androgena u jajniku ... 7
1.5.1.2. Poremećena folikulogeneza ... 8
1.5.2. Poremećaj u lučenju gonadotropina ... 9
1.5.3. Poremećaji u lučenju i djelovanju inzulina ... 9
1.6. Genetika sindroma policističnih jajnika ... 10
1.6.1. Nasljeđivanje PCOS-a ... 11
1.6.2. Genski polimorfizmi ... 11
1.6.3. Metode koje se primjenjuju u genetičkim studijama o PCOS-u ... 12
1.6.4. Geni kandidati za PCOS ... 12
1.7. Geni kandidati odabrani za ovo istraživanje ... 14
1.7.1.Gen *AR* ... 15
1.7.2. Gen *SHBG* ... 15
1.7.3. Gen *INS* ... 16
1.7.4. Gen *INSR* ... 16
1.7.5. Gen *IRS-1* ... 17
1.7.6. Gen *PPAR-γ* ... 17
2. CILJEVI, HIPOTEZA I SVRHA ISTRAŽIVANJA ... 19
3. ISPITANICE, MATERIJALI I METODE ... 21
3.1. Ispitanice ... 21
3.2. Biokemijske analize ... 22
3.3 Molekularnogenetičke analize ... 23
3.3.1. Izolacija genomske DNA ... 23
3.3.2. Molekularnogenetička analiza mikrosatelitnih polimorfizama $(CAG)_n$ *AR* i $(TAAAA)_n$ *SHBG* ... 23
3.3.2.1. Analiza mikrosatelitnoga polimorfizma $(CAG)_n$ u genu *AR* ... 24
3.3.2.2. Analiza mikrosatelitnoga polimorfizma $(TAAAA)_n$ u genu *SHBG* ... 24
3.3.3. Molekularnogenetička analiza minisatelitnoga polimorfizma VNTR-a u genu *INS* ... 26
3.3.4. Molekularnogenetička analiza polimorfizama jedne baze ... 26
3.4. Statistička obradba ... 27
4. REZULTATI ... 29
4.1. Kliničke i biokemijske značajke ispitanica ... 29

4.2. Molekularnogenetičke analize 31
4.2.1. Mikrosatelitni polimorfizam *(CAG)$_n$* u egzonu 1 gena *AR* 31
4.2.1.1. Povezanost (CAG)$_n$ *AR* s PCOS-om 31
4.2.1.2. Povezanost (CAG)$_n$ *AR* s kliničkim i biokemijskim značajkama PCOS-a 32
4.2.1.3. Povezanost (CAG)$_n$ s kliničkim i biokemijskim znakovima povišenih androgena 34
4.2.2. Mikrosatelitni polimorfizam (TAAAA)$_n$ u promotoru gena *SHBG* 35
4.2.2.1. Povezanost (TAAAA)$_n$ gena *SHBG* s PCOS-om 35
4.2.2.2. Povezanost (TAAAA)$_n$ gena *SHBG* s biokemijskim i kliničkim značajkama PCOS-a 37
4.2.2.3. Povezanost (TAAAA)$_n$ *SHBG*-a sa serumskim vrijednostima SHBG-a 38
4.2.3. Polimorfizam jedne baze Asp327Asn gena *SHBG* 39
4.2.3.1. Povezanost Asp327Asn *SHBG* s PCOS-om 39
4.2.3.2. Povezanost Asp327Asn *SHBG* sa serumskim vrijednostima SHBG-a i androgena 40
4.2.3.3. Povezanost polimorfizama Asp327Asn i (TAAAA)$_n$ gena *SHBG* 41
4.2.4. Minisatelitni polimorfizam VNTR-a u promotoru gena *INS* 42
4.2.4.1. Povezanost *INS* VNTR alela s PCOS-om 42
4.2.4.2. Povezanost *INS* VNTR alela s vrijednostima inzulina u PCOS-skupini 42
4.2.5. Polimorfizam jedne baze C/T u egzonu 17 gena *INSR* 43
4.2.5.1. Povezanost C/T *INSR* s PCOS-om 43
4.2.5.2. Povezanost C/T *INSR* s vrijednostima inzulina i inzulinskom rezistencijom u bolesnica s PCOS-om 44
4.2.6. Polimorfizam jedne baze Gly972Arg gena *IRS-1* 45
4.2.6.1. Povezanost Gly972Arg gena *IRS-1* s PCOS-om 45
4.2.6.2. Povezanost Gly972Arg gena *IRS-1* s vrijednostima inzulina i inzulinskom rezistencijom 46
4.2.7. Polimorfizam jedne baze *Pro*12*Ala* gena *PPAR-γ* 47
4.2.7.1. Povezanost Pro12Ala gena *PPAR-γ* s PCOS-om 47
4.2.7.2. Povezanost Pro12Ala gena *PPAR-γ* s vrijednostima inzulina i inzulinskom rezistencijom u bolesnica s PCOS-om 48
5. RASPRAVA 51
5.1. Kliničke i biokemijske značajke istraživane populacije 51
5.2. Povezanost istraživanih polimorfizama s PCOS-om 53
5.2.1. Mikrosatelitni polimorfizam (CAG)$_n$ gena *AR* 53
5.2.2. Mikrosatelitni polimorfizam (TAAAA)$_n$ i polimorfizam jedne baze Asp327Asn gena *SHBG* 56
5.2.3. Minisatelitni polimorfizam (VNTR)$_n$ gena *INS* te polimorfizmi jedne baze C/T gena *INSR* te Gly972Arg gena *IRS-1* 58
5.2.4. Polimorfizam jedne baze Pro12Ala gena *PPAR-γ* 61
6. ZAKLJUČCI 63
7. SAŽETAK 64
8. SUMMARY 65
9. POPIS LITERATURE 67
10. ŽIVOTOPIS AUTORA 79

POPIS OZNAKA I KRATICA

A	androstendion
AES	engl. *Androgen Excess Society* – Udruženje za hiperandrogena stanja
AMH	Anti-Müllerov hormon
AR	androgeni receptor
BMI	engl. *Body Mass Index* – indeks tjelesne mase
bp	engl. *base pair* – parovi baza
DHEAS	dehidroepiandrosteron-sulfat
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
E_2	estradiol
ESHRE /ASRM	engl. *European Society of Human Reproduction and Endocrinology/ American Society of Reproductive Medicine* – Europsko udruženje za humanu reprodukciju i ginekološku endokrinologiju/Američko udruženje za reproduktivnu medicinu
FG	Ferriman-Gallwey
FSH	hormon koji stimulira folikule
GIR	engl. *Glucose to Insulin Ratio* – omjer glukoze i inzulina
GnRH	engl. *Gonadotropin Releasing Hormone* – hormon koji oslobađa gonadotropine
HDL	engl. *High-Density Lipoprotein cholesterol* – kolesterol visoke gustoće
HOMA-IR	engl. *HOmeostasis Model of Assessment-Insulin Resistance* – homeostatički model procjene inzulinske rezistencije
INS	inzulin
INSR	inzulinski receptor
IRS	supstrat za inzulinski receptor
ITM	indeks tjelesne mase
LD	engl. *Linkage Disequilibrium* – neravnoteža vezanosti gena
LH	luteotropni hormon
MAP	engl. *Mitogen-Activated Protein* – mitogen aktivirajući protein
NIH	engl. *National Institutes of Health* – Nacionalni instituti za zdravlje – SAD
NKAH	neklasična kongenitalna adrenalna hiperplazija
OGTT	engl. *Oral Glucose Tolerance Test* – test opterećenja glukozom
17-OHP	17-hidroksiprogesteron
PCOS	engl. *PolyCystic Ovary Syndrome* – sindrom policističnih jajnika
PCR	engl. *Polymerase Chain Reaction* – lančana reakcija polimerazom
PPT	postprandijalna termogeneza
PPAR-γ	engl. *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma* – peroksisomalnim proliferatorom aktivirani receptor-γ
PRL	prolaktin
SHBG	engl. S*ex Hormone Binding Globulin* – globulin koji veže spolne hormone
slT	slobodni testosteron
SNP	engl. *Single Nucleotide Polymorphism* – polimorfizam u jednom nukleotidu
TDT	engl. *Transmission Disequilibrium Test* – test neravnoteže prijenosa alela
ukT	ukupni testosteron
VNTR	engl. *Variable Number of Tandem Repeats* – varijabilni broj tandemskih ponavljanja
WHR	engl. *Waist to Hip Ratio* – omjer struka i bokova

1. UVOD

Sindrom policističnih jajnika (PCOS) najčešća je endokrinopatija žena reproduktivne dobi. Klinički i/ili biokemijski znakovi povišenih androgena, poremećaji ovulacije i policistični jajnici, glavni su klinički znakovi ovoga sindroma. Često je udružen s debljinom i inzulinskom rezistencijom (1). Unatoč kliničkim i biokemijskim odrednicama PCOS-statusa, etiologija nije dovoljno jasna. Učestala pojavnost unutar obitelji govori u prilog genskoj podlozi sindroma. Velika raznolikost fenotipova, vjerojatno je posljedica međudjelovanja čimbenika okoliša s genskim čimbenicima u podlozi sindroma. Zbog različitih reprodukcijskih i metaboličkih poremećaja koji ga prate, PCOS se smatra najvećim zdravstvenim rizikom u žena reproduktivne dobi (2–5).

1.1. Incidencija

Učestalost sindroma policističnih jajnika je 15 – 22 % ako se koristimo Rotterdamskim kriterijima za dijagnozu (6, 7). Sindrom policističnih jajnika učestaliji je u žena s pozitivnom obiteljskom anamnezom za PCOS, za šećernu bolest tipa 2 i hiperandrogenizam (8). Češći je u adolescenciji – oko 25 %. Nakon četrdesete godine spontano se ublažuje klinička slika i češće su ovulacije. U prijelaznom razdoblju incidencija PCOS-a je oko 15 %, a u perimenopauzi 10 % (9).

1.2. Predispozicija za PCOS

Neki poremećaji u intrauterinom razdoblju i peripubertetu povisuju rizik za kasniji nastanak PCOS-a. Mala porođajna masa s porastom tjelesne mase u dojenačko doba povisuju rizik za 20 % (10, 11). Prijevremena adrenarha (pubarha prije 8 godine života) za 50 % povisuje rizik za kasniji PCOS (12). Prekomjerna tjelesna masa u juvenilno i adolescentno doba najsnažniji je okidač za razvoj i pogoršanje simptoma PCOS-a (11).

1.3. Dijagnostički kriteriji

Heterogenost kliničke slike sindroma policističnih jajnika razlog je da ne postoji jedinstveni kriterij za dijagnozu. Danas se koristimo trima kriterijima: kriterijima NIH-a (engl. *National Institutes of Health* – Nacionalni instituti za zdravlje, SAD), kriterijima (8), ESHRE/ASRM-a (engl. *European Society of Human Reproduction and Endocrinology/American Society of Reproductive Medicine, Rotterdam* – Europsko udruženje za humanu reprodukciju i ginekološku endokrinologiju/Američko udruženje za reproduktivnu

medicinu) kriterijima i kriterijima (6, 7) AES-a (engl. *Androgen Excess Society* – Udruženje za hiperandrogena stanja) (13).

1.3.1. NIH-kriteriji

Prema NIH-kriterijima dijagnoza PCOS-a postavlja se na temelju prisutnosti hiperandrogenizma i/ili hiperandrogenemije, oligo/anovulacije, a nakon isključenja drugih stanja koja su slična sindromu (Cushingov sindrom, kongenitalna adrenalna hiperplazija, hiperprolaktinemija i bolesti štitnjače) (8). Njima su definirana tri klinička fenotipa PCOS-a: (i) hirzutizam, hiperandrogenemija i oligo/anovulacije, (ii) hiperandrogenemija i oligo/anovulacije, (iii) hirzutizam i oligo/anovulacije (8).

1.3.2. ESHRE/ASRM (Rotterdamski) kriteriji

Prema Rotterdamskim kriterijima dijagnoza PCOS-a postavlja se na temelju prisutnosti dvaju od triju sljedećih simptoma: (i) oligo/anovulacije; (ii) kliničkih i/ili biokemijskih znakova hiperandrogenizma; (iii) policističnih jajnika na ultrazvučnom pregledu (6, 7). Diferencijalnodijagnostički potrebno je isključiti druge dijagnoze sa sličnom kliničkom slikom. To su: neklasična kongenitalna adrenalna hiperplazija, Cushingov sindrom, androgen-secernirajući tumori, poremećaji štitnjače, hipogonadotropni hipogonadizam, hiperprolaktinemija, sindromi izrazite inzulinske rezistencije (npr. dijagnoza hiperandrogene na inzulin rezistentne *acanthosis nigricans* (engl. *HARA-IN syndrome*)) te visoke doze egzogeno unesenih androgena (6, 7). Rotterdamski kriteriji zapravo su nastavnica NIH-kriterija koji su nadopunjeni uvođenjem ultrazvučnog nalaza policističnih jajnika u dijagnozu. Time su definirana dva nova fenotipa PCOS-a: (i) bolesnice s ovulatornim ciklusima, ali s kliničkim i/ili biokemijskim hiperandrogenizmom i ultrazvučnim nalazom policističnih jajnika i (ii) bolesnice s policističnim jajnicima i oligo/anovulacijama bez znakova hiperandrogenizma (8).

1.3.3. AES-kriteriji

Udruženje za hiperandrogena stanja predlaže da se dijagnoza PCOS-a postavi na temelju prisutnosti triju kliničkih značajki: (i) povišenih androgena (klinički i/ili biokemijski hiperandrogenizam), (ii) poremećaja ovulacije (oligo/anovulacije i/ili ultrazvučnog nalaza policističnih jajnika) i (iii) isključenjem drugih hiperandrogenih poremećaja ili poremećaja ovulacije (13). Ovim kriterijima definirano je ukupno devet fenotipova PCOS-a i po njima je PCOS primarno hiperandrogeni poremećaj. Autori ovih kriterija naglašavaju da kliničke

značajke simptoma PCOS-a ne moraju biti stalno prisutne, već mogu biti više ili manje izražene ovisno o vanjskim čimbenicima (promjena tjelesne mase, stila života i dobi) (13).

Iako je sindrom policističnih jajnika često udružen s debljinom (30 – 60 % bolesnica), inzulinskom rezistencijom i hiperinzulinemijom (50 – 70% bolesnica) ovi simptomi nisu uključeni u kriterije za dijagnozu PCOS-a jer su učestalo prisutni i u drugim poremećajima koji nisu povezani s PCOS-om (14).

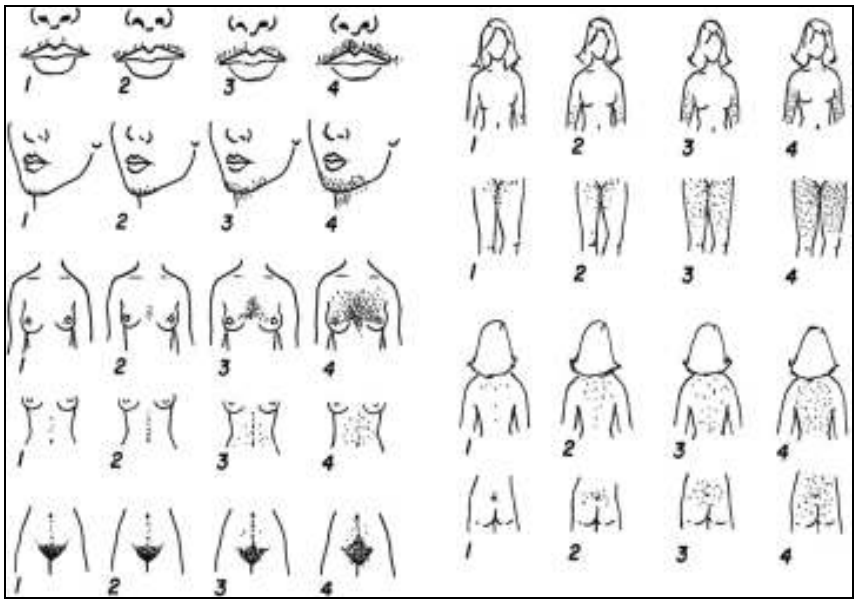
1.4. Dijagnoza PCOS-a

Dijagnoza PCOS-a postavlja se na temelju prisutnosti glavnih značajki sindroma definiranih već navedenim kriterijima, odnosno isključivanjem poznatih poremećaja koji imitiraju PCOS-fenotip.

1.4.1. Dijagnostika glavnih značajki PCOS-a

1.4.1.1. Klinički hiperandrogenizam i/ili biokemijska hiperandrogenemija

Hirzutizam je vodeći simptom kliničkoga hiperandrogenizma u bolesnica s PCOS-om. Definira se povećanim rastom terminalnih dlaka prema muškom načinu raspodjele (15). Težina hirzutizma procjenjuje se modificiranom Ferriman-Gallweyevom ljestvicom (FG-zbroj) koja bodovima od 1 – 4 ocjenjuje težinu hirzutizma na devet određenih dogovorenih mjesta na tijelu, što je prikazano na slici 1. (16, 17). Ukoliko je zbroj bodova veći od 8 govorimo o hiperandrogenizmu (16, 17). Procjenjuje se da oko 50 – 75 % bolesnica s PCOS-om ima hirzutizam (18). Još uvijek ne postoji stav o aknama i androgenoj alopeciji kao jasnome kliničkom znaku hiperandrogenizma u bolesnica s PCOS-om (13, 17). Nije sasvim jasno je li učestalost akni u bolesnica s PCOS-om statistički značajno viša nego u općoj populaciji (13, 19). Akne koje ne nestaju prestankom puberteta, odnosno, postpubertalno nastale akne, mogu biti povezane s povišenim adrogenima u cirkulaciji. Težina akni ocjenjuje se prema Cunliffu (20), a alopecija prema Ludwigovoj ljestvici (21).



Slika 1. Modificirana Ferriman-Gallweyeva ljestvica (17)

Biokemijski dokaz hiperandrogenemije jest nalaz povišenih androgena u cirkulaciji. Testosteron cirkulira u plazmi nespecifično vezan uz albumin, specifično vezan uz SHBG (engl. S*ex Hormone Binding Globulin*, globulin koji veže spolne hormone) i u malom postotku slobodan. Biokemijski se hiperandrogenemija najčešće određuje mjerenjem ukupnoga serumskog testosterona (ukT) i SHBG-a iz čega se izračunava slobodna, odnosno bioraspoloživa frakcija testosterona (22). Koncentracija drugih androgena u serumu, androstendiona ili DHEAS-a (dehidroepiandrosteron-sulfata), obično je povišena u žena s PCOS-om, ali izolirano je povišena u manje od 10% slučajeva (13).

Određivanje vrijednosti testosterona u žena podložno je brojnim kritikama. Normalne granice, određene danas dostupnim kitovima, primarno su postavljene prema muškoj populaciji te su stoga osjetljivije na više vrijednosti androgena (6, 7, 23). Postoji velika varijabilnost unutar normalnih granica za žensku populaciju. Primjerice, dob i ITM bolesnica nisu uzeti u obzir prilikom određivanja normalnih granica te postoji malo podataka o normalnim vrijednostima u adolescentica i starijih žena (6, 7). Analizom androgena u serumu ne uspiju se dokazati povišene vrijednosti u oko 20 – 40 % žena s hirzutizmom i policističnim jajnicima (1, 5, 18). Upravo se zbog navedenoga smatra da normalne vrijednosti androgena u serumu ne isključuju dijagnozu PCOS-a u prisutnosti ostalih znakova.

1.4.1.2. Poremećaji menstruacijskog ciklusa – oligo/anovulacije

Poremećaji ciklusa su, uz hiperandrogenemiju, najčešći simptom sindroma policističnih jajnika. Nalazimo ih u 60 – 85 % bolesnica i najčešće se očituju kao oligomenoreje (manje od 8 ciklusa godišnje ili ciklusi dulji od 35 dana), rjeđe kao amenoreje (izostanak menstruacije dulje od 6 mjeseci) ili polimenoreje (ciklusi kraći od 21 dan) (5, 18, 24). Poremećaji ciklusa najčešće su prisutni od menarhe. Redoviti menstruacijski ciklus nije potvrda ovulacije. Određivanjem razine progesterona u 2. fazi ciklusa u žena s PCOS-om i eumenorejom nađena je anovulacija u oko 20 – 30 % žena (11). Određivanjem vrijednosti prolaktina i LH-a u serumu, moraju se isključiti amenoreje koje su posljedica bolesti hipotalamusa i hipofize (6, 7).

1.4.1.3. Ultrazvučni nalaz policističnih jajnika

Intraovarijski hiperandrogenizam potiče regrutaciju i rast većeg broja folikula koji su potom zaustavljeni u veličini 6 – 9 mm što daje karakterističnu ultrazvučnu sliku policističnih jajnika (25).

Konsenzusom u Rotterdamu postavljeni su sljedeći kriteriji za ultrazvučnu dijagnozu policističnih jajnika (6, 7, 26): (i) policistični jajnik s 12 ili više folikula 2 – 9 mm u promjeru i (ii) povišeni volumen jajnika > 10 cm^3 te (iii) dostatnost ovih nalaza na samo jednom jajniku. Volumen jajnika se izračunava prema formuli: (0,5 × duljina × širina × debljina). Broj folikula se procjenjuje u svim trima ravninama i veličina folikula se izražava kao središnji promjer mjeren u sva tri smjera (6, 7, 26). Ovim konsenzusom definirane su i tehničke preporuke koje uključuju: kvalitetan UZV-uređaj, školovanog ultrasoničara te transvaginalni pristup kad je god to moguće. Ultrazvučni pregled u žena s redovitim ciklusima treba biti u ranoj folikularnoj fazi (3. – 5. dan). Bolesnice s oligo/amenorejom bilo kad ili 3. – 5. dan gestagenom induciranoga ciklusa. Ako postoji dominantan folikul (> 10 mm) potrebno je ultrazvučni pregled ponoviti u sljedećem ciklusu (6, 7, 26).

1.4.1.4. Isključivanje ostalih hiperandrogenih stanja ili poremećaja ovulacije

Sva stanja koja imitiraju PCOS-fenotip moraju biti isključena. Neklasični oblik kongenitalne adrenalne hiperplazije (NKAH) isključuje se određivanjem jutarnjih bazalnih vrijednosti 17-hidroksiprogesterona (17-OHP) u folikularnoj fazi ciklusa (24). Određivanjem FSH-a i E_2 u žena s oligo/anovulacijama koristimo se da bismo isključili hipogonadotropni

hipogonadizam ili prijevremenu menopauzu. Cushingov sindrom se isključuje na temelju kliničke slike i određivanjem slobodnoga kortizola u 24-satnom urinu (6, 7, 24). Rjeđi uzroci hiperandrogene kronične anovulacije mogu biti bolesti štitnjače i hiperprolaktinemija, koje se isključuju određivanjem hormona štitnjače i prolaktina. Prolaktin se učestalo rutinski određuje u hiperandrogenih bolesnica. Normalno nalazimo razinu prolaktina na gornjoj granici ili čak malo više od gornje granice (6, 7).

1.4.1.5. Dijagnostika metaboličkih poremećaja povezanih s PCOS-om

Danas ne postoje općeprihvaćeni i pouzdani klinički testovi za detekciju inzulinske rezistencije u općoj populaciji. Testovi koji se najčešće primjenjuju u praksi izračunani su iz vrijednosti inzulina i glukoze na tašte. To su GIR (engl. *Glucose to Insulin Ratio* – omjer glukoze i inzulina) i HOMA – IR (engl. *Homeostasis Model of Assesment – Insulin Resistance* – homeostatički model procjene inzulinske rezistencije) (6, 7).

Konsenzusom u Rotterdamu dogovoreni su klinički kriteriji za dijagnozu metaboličkoga sindroma u bolesnica s PCOS-om, a koji uključuju prisutnost triju od pet kliničkih značajki prikazanih u tablici 1. (6, 7). Istim konsenzusom predložene su sljedeće preporuke za probir metaboličkih poremećaja u bolesnica s PCOS-om:

- testovi inzulinske rezistencije nisu potrebni da bi se postavila dijagnoza PCOS-a, niti su potrebni za odabir liječenja,
- bolesnicama s pretjeranom tjelesnom masom (ITM > 27 kg/m^2) potrebno je učiniti probir za metabolički sindrom, što uključuje kriterije navedene u tablici 1. i test netolerancije glukoze (OGTT),
- nužne su daljnje studije o korisnosti ovih testova u bolesnica normalne tjelesne mase. Probir u ovoj skupini potreban je samo ako postoje dodatni čimbenici rizika za inzulinsku rezistenciju kao što je pozitivna obiteljska anamneza za šećernu bolest (6, 7).

Tablica 1. Učestalost (%) pojedinačnih sastavnica metaboličkoga sindroma u bolesnica s PCOS-om (27)

Sastavnice metaboličkoga sindroma	Učestalost (%)
opseg struka > 88 cm	80
HDL-kolesterol < 1,3 mmol/L	66
trigliceridi ≥ 1,7 mmol/L	32
hipertenzija ≥ 130/85 mm Hg	21
glukoza na tašte ≥ 6,1 mmol/L	5

1.5. Patofiziologija sindroma policističnih jajnika

Sindrom policističnih jajnika je endokrinološko-metabolički poremećaj pri kojemu više predisponirajućih gena u kombinaciji s čimbenicima okoliša (posebno nutritivnim) uzrokuje očitovanje heterogene kliničke slike (28). Središnji je poremećaj u jajniku, ali je on nedvojbeno povezan s poremećajima na razini hipofizno-hipotalamične osi te poremećajima u sekreciji i djelovanju inzulina (29). Danas se smatra da je mehanizam nastanka PCOS-a jedan od najsloženijih patofizioloških mehanizama u medicini.

1.5.1. Poremećaj funkcije jajnika

1.5.1.1. Pojačana biosinteza androgena u jajniku

Jajnik je glavni izvor androgena u bolesnica s PCOS-om. Glavno mjesto sinteze androgena je sloj teka-stanica u razvojnom folikulu (15).

Molekularni i stanični mehanizmi koji su u podlozi povećanoga stvaranja androgena u jajniku u bolesnica PCOS-om, predmet su intenzivnih znanstvenih istraživanja. *In vitro* pokusi na svježe izoliranim kulturama teka-stanica iz policističnih jajnika upućuju na pojačano bazalno i stimulirano lučenje androgena i njihovih prekursora u usporedbi s teka-stanicama zdravih jajnika (30, 31). Ekstraovarijski čimbenici koji utječu na pojačanu biosintezu androgena jesu povećana sekrecija LH-a te povišena razina inzulina koji svoja djelovanja ostvaruju izravnom stimulacijom signalnih puteva u stanicama jajnika (29).

1.5.1.2. Poremećena folikulogeneza

Poremećaji ovulacije u bolesnica s PCOS-om povezani su s poremećenim antralnim stadijem folikularnoga razvoja u kojemu je rast folikula "zaustavljen". Policistični jajnici imaju dva do šest puta veći broj primarnih, sekundarnih i malih antralnih folikula (promjera 5 – 8 mm) u odnosu na zdrave jajnike (32).

Danas se vrlo malo zna o molekularnim mehanizmima koji kontroliraju regrutaciju i rani rast folikula. Eksperimentalnim studijama na Rhesus-majmunicama pokazalo se da kratkotrajna izloženost androgenima stimulira rane stadije rasta folikula. Ovi stadiji rasta ne ovise o fazi ciklusa ili o stimulaciji gonadotropinima (33, 34). Stimulacija androgenima odvija se preko androgenih receptora koji se nalaze u granuloznim i teka-stanicama. Ako se izlaganje androgenima nastavi tijekom duljeg razdoblja dolazi do kolapsa folikula u ovarijsku stromu. Posljedično dolazi do hipertrofije ovarijske strome, nalaz tipičan za PCOS i kronično izlaganje androgenima (33, 34).

"Zaustavljen" rast folikula, koji nalazimo u policističnom jajniku ne može se u cijelosti objasniti izlaganjem androgenima. Pretpostavlja se da povećani broj malih folikula stvara više AMH-a (Anti-Müllerova hormona). Ovaj hormon inhibira učinak hormona koji stimulira folikule (FSH) na aktivnost aromataze (35). Drugi pretpostavljeni mehanizam je da granulozne stanice u bolesnica s PCOS-om s anovulacijama, preuranjeno izražavaju LH-receptore, što uzrokuje njihovo prerano sazrijevanje i konačno "zaustavljeni" rast (36).

"Zaustavljenom" rastu dodatno pridonosi inzulin. Postreceptorski signalni put kojim se odvija metabolizam glukoze različit je od onoga kojim se potiče steroidogeneza (37). Smatra se da je u bolesnica s PCOS-om poremećen postreceptorski signalni put za metabolizam glukoze što dovodi do smanjenja energijskih zaliha u folikulu, a to "zaustavlja" njihov rast (37). Hiperinzulinemija koja često prati PCOS, povisuje osjetljivost granuloza-stanica na luteotropni hormon (LH), što dodatno pridonosi prijevremenoj luteinizaciji (36).

"Zaustavljen" rast folikula dovodi do izostanka selekcije dominantnoga folikula i ovulacije.

1.5.2. Poremećaj u lučenju gonadotropina

Bolesnice s policističnim jajnicima imaju poremećeno lučenje gonadotropina. Pojačano se luči LH dok se normalno ili sniženo luči FSH. Karakteristično je povećan LH/FSH omjer (38).

Poremećeno lučenje gonadotropina vjerojatno je rezultat poremećenoga lučenja hormona iz jajnika jer nije nađen primarni hipotalamični poremećaj kojim bi se mogle objasniti neuroendokrine promjene karakteristične za PCOS. Povišene vrijednosti androgena smanjuju osjetljivost hipotalamusa na negativnu povratnu spregu progesterona. Dodatno, u žena s PCOS-om izostaje selekcija dominantnoga folikula, a time i stvaranje povišenih vrijednosti progesterona. Niske vrijednosti progesterona uzrokuju povišenu pulsatilnost hormona koji otpušta gonadotropine (GnRH). Povišena pulsatilnost GnRH-a favorizira lučenje LH-a u odnosu na FSH što za posljedicu ima poremećen odnos LH/FSH. Povišena razina LH-a dodatno stimulira teka-stanice folikula jajnika na stvaranje androgena. Zbog povišenih vrijednosti inhibina B i slobodnih estrogena u cirkulaciji, te lokalnih parakrinih učinaka androgena i AMH-a, smanjena je aktivnost FSH-a (38).

1.5.3. Poremećaji u lučenju i djelovanju inzulina

Gotovo 80 % bolesnica s PCOS-om i pretjeranom tjelesnom masom te oko 30 – 40 % žena s PCOS-om i normalnom tjelesnom masom ima inzulinsku rezistenciju (27). Mehanizam kojim nastaje inzulinska rezistencija u bolesnica s PCOS-om nije u potpunosti poznat (39, 40). Ne može se tumačiti isključivo povećanom tjelesnom masom jer veliki broj bolesnica s PCOS-om i normalnom tjelesnom masom ima inzulinsku rezistenciju (27).

Inzulin ima višestruke biološke učinke na ciljna tkiva. Osim učinka na metabolizam glukoze, inzulin je uključen u regulaciju metabolizma lipida i aminokiselina, sintezu proteina te u mehanizme staničnoga rasta i diferencijacije (39, 40). Inzulinska rezistencija u bolesnica s PCOS-om obilježena je nedovoljnom osjetljivošću tkiva na inzulin pri čemu su neka tkiva rezistentna na inzulin (adipociti, skeletni mišići), a druga visokoosjetljiva (jajnici, nadbubrežna žlijezda) (41).

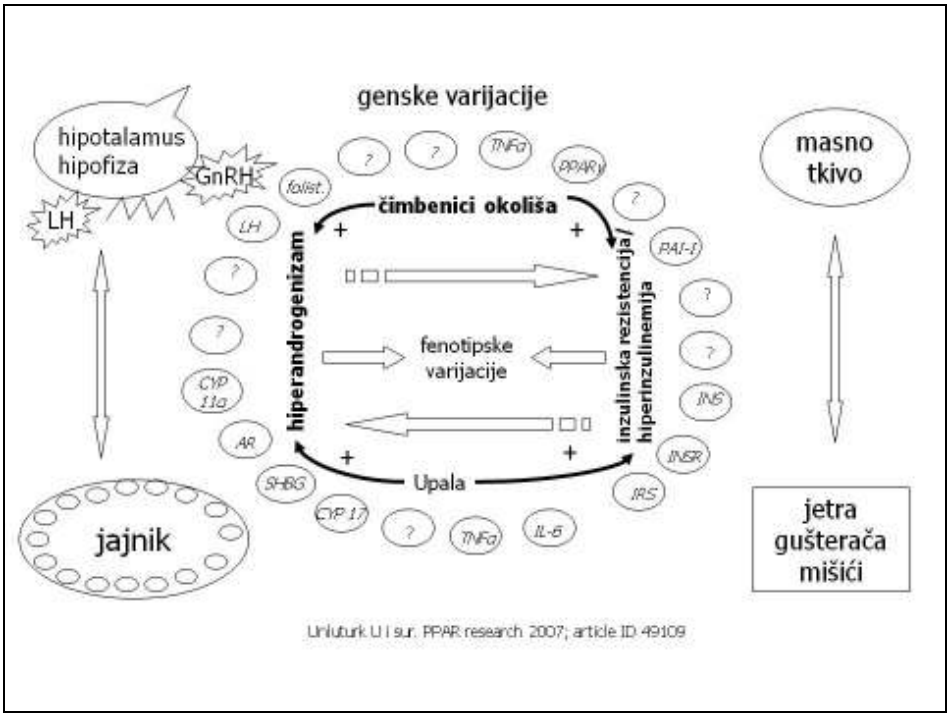
Eksperimentalno je pokazano da u oko 50 % bolesnica s PCOS-om nakon vezanja inzulina dolazi do serinske fosforilacije β-lanca inzulinskog receptora. Time dolazi do inhibicije prijenosa signala čiji uzročni čimbenik nije otkriven (40, 41). Istražuje se moguća

genska podloga u polimorfizmima gena koji kodiraju inzulinski receptor, ali i gena za inzulinske receptorske supstrate (IRS-1 i IRS-2) koji imaju ključnu ulogu u usmjerivanju postreceptorskoga signala (40, 42).

Gotovo sve bolesnice s PCOS-om i prekomjernom tjelesnom masom imaju inzulinsku rezistenciju (9, 43). Adipociti luče čitav niz proteina koji imaju učinak nalik hormonskim učincima, skupno nazvanih adipokinima. Danas se najviše istražuje utjecaj leptina, adiponektina i rezistina na metaboličke poremećaje uzrokovane debljinom. Sve je više dokaza da poremećena produkcija adipokina – visok leptin i rezistin, nizak adiponektin utječu na poremećenu aktivnost inzulina i IGF-a, steroidogenezu u jajniku, a time i kontrolu menstruacijskoga ciklusa (44, 45). Poremećena ravnoteža adipokina otežava sazrijevanje jajne stanice, oplodnju, implantaciju i pravilan razvoj fetusa. Leptin inhibira ovarijsku steroidogenezu i dovodi do anovulacija. Debljina u žena s PCOS-om pojačava inzulinsku rezistenciju, hiperandrogenizam i dislipidemiju (43).

1.6. Genetika sindroma policističnih jajnika

Sindrom policističnih jajnika složeni je genski poremećaj koji nastaje u nosioca predisponirajućih genskih varijacija kao odgovor na složeni utjecaj čimbenika okoliša (46). Rezultat je izražavanje različitih fenotipskih varijanti (slika 2.).



Slika 2. Etiologija i patogeneza PCOS-a (47).

1.6.1. Nasljeđivanje PCOS-a

Velika učestalost ovoga sindroma u pojedinim obiteljima govori u prilog genskoj uvjetovanosti. Poznato je da 35 % majki i 40 % sestara bolesnica s PCOS-om ima ovaj poremećaj. Dodatno još 24 % sestara ima hiperandrogenemiju (48). Studije na blizancima pokazale su koeficijent nasljednosti od 0,79 (49). Čini se da bolesnice s PCOS-om imaju genetičku kontrolu inzulinske rezistencije i hiperinzulinemije. Sestre bolesnica s PCOS-om koje imaju PCOS ili hiperandrogenizam imaju smanjenu osjetljivost na inzulin u odnosu na sestre bez PCOS-a (50).

1.6.2. Genski polimorfizmi

Genski polimorfizmi podrazumijevaju genske varijacije koje označuju gensku raznolikost između jedinki. Oni nisu povezani s mutacijama koje imaju učinak "sve ili ništa" već stvaraju predispoziciju za promijenjenu ekspresiju pojedinih gena. Tijekom generacija prošire se u populaciji s učestalošću većom od 1%. To ostvaruju ne mijenjajući znatno funkciju gena. Naslijeđena kombinacija ovakvih "blagih" genskih varijanti sinergističkim učinkom stvara predispoziciju za nastanak bolesti (51). U haploidnom ljudskom genomu, koji sadržava $3{,}2 \times 10^9$ parova baza (pb), polimorfizmi se nalaze na svakih 300 – 1.000 pb, što znači da ih ukupno ima 3 do 10 milijuna (52). Rabimo ih kao genetičke biljege za istraživanja u populacijskoj genetici, mapiranju gena te za identifikaciju jedinki (28). Najčešća vrsta genskoga polimorfizma jest polimorfizam jedne baze – SNP-a (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) pri čemu dolazi do promjene (supstitucije) jednoga nukleotida na određenom mjestu u molekuli DNA (52). Mikrosatelitni se polimorfizmi sastoje od varijabilnih blokova kratkih ponavljanja nukleotidnih sekvencija (1 – 4 pb), koje se ponavljaju oko 2 do 10 puta (53). Minisateliti ili VNTR (engl. *Variable Number of Tandem Repeats* – varijabilni broj tandemskih ponavljanja) jesu polimorfizmi obilježeni ponavljanjem dužih sljedova (20 – 500 pb) (53).

Genski polimorfizmi koji naizgled ne utječu na funkcionalnost proteina koji kodira zadani gen, također mogu biti zanimljivi za istraživanje jer se mogu nalaziti u neravnoteži vezanosti gena (engl. *Linkage Disequilibrium*, LD) s mogućim odgovornim polimorfizmom (engl. *causal variant*) i mogu biti njegovi biljezi (52).

1.6.3. Metode koje se primjenjuju u genetičkim studijama o PCOS-u

Tehnike molekularne genetike koje se primjenjuju u genetičkim studijama o PCOS-u jesu analiza vezanosti (engl. *linkage analysis*), test neravnoteže prijenosa alela (engl. *Transmission Disequilibrium Test, TDT*) i asocijacijske studije (engl. *association analysis* – studije povezanosti) (46).

Analiza vezanosti je metoda kojom se identificiraju geni (kromosomske regije) koji kosegregiraju s bolešću među članovima obitelji (52). Nepoznati obrazac nasljeđivanja, varijabilna penetrantnost genske promjene te mali uzorak ispitanica ograničuju uspješnost ove metode. PCOS je povezan sa smanjenom plodnošću, što umanjuje broj potomaka unutar generacija koje se analiziraju (46).

Test neravnoteže prijenosa alela (engl. *Transmission Disequilibrium Test, TDT*) je obiteljska studija (engl. *family based study*) koja uključuje više članova iste obitelji u kojima se prati nasljeđivanje alela s roditelja na oboljelo dijete da bi se utvrdila povezanost polimorfizma i bolesti (46, 52).

Asocijacijske studije (engl. *case-control studies*) najčešće se primjenjuju u istraživanjima genske podloge PCOS-a. Istraživački cilj ovih studija jest pronaći gene povezane s PCOS-om unutar populacije. Studije povezanosti testiraju, pojavljuju li se pojedini genetički biljezi s većom učestalošću u populaciji oboljelih (engl. *case*) u odnosu na opću zdravu populaciju (engl. *control*) (52). Gen, odnosno genski polimorfizam, koji analiziramo u ovim studijama odabran je na temelju njegove pretpostavljene uloge u patofiziološkom mehanizmu nastanka bolesti pa ga nazivamo genom kandidatom. Njegove polimorfne varijante povezuju se s različitim fenotipskim karakteristikama bolesnica s PCOS-om u određenoj populaciji (28).

1.6.4. Geni kandidati za PCOS

Geni kandidati koji su do sada istraživani uključeni su u poznate patofiziološke puteve koji pridonose nastanku PCOS-a i možemo ih podijeliti na:

- gene kandidate uključene u steroidogenezu u jajniku i nadbubrežnoj žlijezdi,
- gene kandidate uključene u djelovanje steroidnih hormona,
- gene kandidate uključene u djelovanje i regulaciju gonadotropina,
- gene kandidate uključene u djelovanje i sekreciju inzulina,

- gene kandidate uključene u energijsku homeostazu,
- gene kandidate uključene u mehanizam kronične upale (47).

Tablica 2. Prikaz do danas istraživanih gena kandidata za PCOS (47)

GEN	LOKUS/VARIJANTA
1. Geni koji su uključeni u steroidogenezu u jajniku i nadbubrežnoj žlijezdi (za enzime steroidogeneze)	
CYP 11a	$(tttta)_n$
	D15S519
	D15S520
CYP 21	heterozigotnost za CYP 21 mutacije
CYP 17	–34T/C[(c)]SNP
	D10S192
	T/C promjena 5'[(d)]PR
CYP 19	$(tttta)_n$/D15S103
2. geni uključeni u djelovanje steroidnih hormona	
AR	**$(CAG)_n$**
SHBG	**$(TTTTA)_n$**
	Asp327Asn
	D17S1353
3. geni uključeni u djelovanje i regulaciju gonadotropina	
LHβ	Trp8Arg; Ilg15Thr
	Ser102Gly
Folistatin	D5S474
	D5S623
	D5S822
4. geni uključeni u djelovanje i sekreciju inzulina	
INS	***INS* VNRT**
INSR	D19S884
	C10923T
IRS	**Gly972Arg (*IRS-1*)**
	Gly1057Asp (*IRS-2*)
CAPN10	UCSNP-19, -43, -63 UCSNP-44 UCSNP-45

Tablica 2. Prikaz do danas istraživanih gena kandidata za PCOS (47) – nastavak

5. Geni uključeni u energijsku homeostazu	
Leptin gen i receptor	skeniranje za mutacije i polimorfizme u genu za leptinski receptor
Adiponektin gen	T45G u egzonu 2 G276T u intronu 2
PPAR-y	D3S1263
	Pro12Ala
	CAC478CAT
5. geni uključeni u mehanizam kronične upale	
TNF-α	– 308 G/A
TNFR2	Met196Arg
IL-6	– 174 G/C
IL-6 signalni prijenosnik gp 130	Gly148Arg
IL-6 receptor-α	CA-ponavljanja

1.7. Geni kandidati odabrani za ovo istraživanje

U ovoj studiji analizirali smo sedam različitih genskih polimorfizama u šest različitih gena kandidata:

- mikrosatelitni polimorfizam $(CAG)_n$ gena *AR*,
- mikrosatelitni polimorfizam $(TAAAA)_n$ gena *SHBG*,
- polimorfizam jedne baze Asp327Asn gena *SHBG*,
- minisatelitni polimorfizam gena *INS*,
- polimorfizam jedne baze C/T gena *INSR*,
- polimorfizam jedne baze Gly792Arg gena *IRS-1*,
- polimorfizam jedne baze Pro12Ala gena *PPAR-γ*.

Genski polimorfizmi za ovo istraživanje odabrani su na temelju pozitivnih nalaza asocijacijskih studija u drugim populacijama bolesnica s PCOS-om, a nakon podrobnoga pregleda literature. Svi navedeni polimorfizmi dokazano utječu na transkripcijsku aktivnost gena u *in vitro* pokusima (54–60). PCOS je složena genska bolest i smatra se da je potrebno uložiti dodatne napore u provođenje replikacijskih studija s većim brojem ispitanica, a koje bi

potvrdile ili opovrgle pozitivne nalaze prethodnih studija (61). Ovo je bila misao vodilja našeg istraživanja.

1.7.1.Gen *AR*

Androgeni ostvaruju svoju aktivnost vežući se za androgeni receptor koji pripada obitelji nuklearnih transkripcijskih čimbenika. Androgeni receptor kodiran je genom *AR* koji se nalazi na poziciji Xq11-12 kromosoma i sastoji se od triju funkcionalnih domena: N-terminalna domena, DNA-vežuća domena i ligand-vežuća domena (62). U egzonu 1 ovoga gena prisutno je visoko polimorfno trinukleotidno ponavljanje CAG_n koje kodira poliglutaminski zapis na N-terminalnom kraju (N = 11 – 38, prosječno 20) (54). Transkripcijska aktivnost androgenog receptora obrnuto je razmjerna s brojem CAG-ponavljanja u *in vitro* istraživanjima (54). Povećana aktivnost gena *AR* u hiperandrogenih bolesnica s kraćim brojem CAG-ponavljanja moguće utječe na veću izraženost hiperandrogenih stigmi uz normalne serumske vrijednosti androgena (63). Dosadašnje studije u bolesnica s PCOS-om pokazale su da CAG_n polimorfizam gena *AR* u normalnom rasponu ponavljanja utječe na serumsku koncentraciju testosterona u bolesnica s PCOS-om, ali s različitim rezultatima (64–70).

1.7.2. Gen *SHBG*

SHBG (engl. *Sex Hormone-Binding Globulin*) regulira koncentraciju slobodnih hormona koji djeluju na ciljna tkiva. Humani SHBG je homodimerni glikoprotein kodiran genom lociranim na 17p12-p13 kromosomu (71, 72). U promotorskoj regiji gena *SHBG* nađeno je polimorfno pentanukleotidno ponavljanje $(TAAAA)_n$ koje utječe na transkripcijsku aktivnost gena *SHBG* (55). Smatra se da upravo ovaj funkcionalni polimorfizam pridonosi individualnim razlikama u razinama SHBG-a u plazmi, a time i razini slobodnih hormona u cirkulaciji (73). Bolesnice s PCOS-om, s povećanim brojem $(TAAAA)_n$-ponavljanja imaju niže vrijednosti SHBG-a (73). Xita i suradnici pokazali su znatnu povezanost duljine $(TAAAA)_n$-ponavljanja s PCOS-om u grčkoj populaciji bolesnica (70). Cousin i sur. pokazali su da su duži $(TAAAA)_n$-aleli učestalije prisutni u bolesnica s hirzutizmom (74). Serumske vrijednosti SHBG-a znatno su niže u nosilaca $(TAAAA)_n$-polimorfizma većeg broja ponavljanja neovisno o PCOS-statusu (75). Opisana povezanost serumskih vrijednosti SHBG-a s $(TAAAA)_n$-polimorfizmom pokazana je i u muškoj populaciji (76–78).

Polimorfizam jedne nukleotide – SNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) G u A u egzonu 8 gena *SHBG* rezultira supstitucijom asparagina za aspartičnu kiselinu na 327. kraju (Asp327Asn) gena *SHBG*. U životinjskom modelu dodatni ugljikohidratni lanac u SHBG-proteinu, kodiran Asn327 alelom, smanjuje metabolički klirens te produljuje poluvijek proteina. Posljedično, nosioci ovoga polimorfizma imaju više razine SHBG-a u serumu (56). Povezanost ovoga polimorfizma s razinama SHBG-a u serumu pokazana je u studiji na zdravim postmenopauzalnim ženama (79) kao i u populaciji hirzutističnih žena iz Francuske (74). Cousin i sur. su, također, pokazali snažnu neravnotežu povezanosti (LD – engl. *Linkage Disequilibrium*) ovog alela s osam $(TAAAA)_n$-ponavljanja (74). Zbog pretpostavljenoga duljeg poluvijeka SHBG-a u nosioca Asn327-polimorfizma, ispitan je i pokazan njegov utjecaj na smanjeni rizik za karcinom dojke (80, 81).

1.7.3. Gen *INS*

Spoznaja da veliki broj žena s PCOS-om ima inzulinsku rezistenciju s kompenzatornom hiperinzulinemijom, neovisno o stupnju debljine, dovela je do pretpostavke da je u takvih bolesnica etiologija PCOS-a vjerojatno povezana s poremećajem u ekspresiji gena za inzulin (82–84). Gen za inzulin nalazi se na lokaciji 11p15.5. Minisatelitni polimorfizam na 5' kraju regulatorne regije (VNTR *INS*) regulira transkripciju gena za *INS* (57, 82). Ovisno o broju ponavljanja *INS* VNTR-aleli podijeljeni su u tri kategorije. Kategorija I alela sastoji se od kraćih polimorfnih ponavljanja s prosječnom duljinom od 40 ponavljanja – kratki aleli. Kategorija II alela ima prosječno 80 ponavljanja – srednje dugi aleli, dok se kategorija III alela sastoji od najduljih polimorfnih ponavljanja – prosječno 157 – dugi aleli (57). U *in vitro* uvjetima pokazano je da dulji aleli imaju veću transkripcijsku aktivnost (85). Waterworth i sur. prvi su istraživali povezanost *INS* VNTR-polimorfizama u obiteljima s PCOS-om te ranim gubitkom kose u muškaraca (84). Pokazali su da su PCOS-fenotipovi povezani s III. kategorijom alela na *INS* VNTR-lokusu. Ferk i sur. pokazali su da je kategorija III *INS* VNTR-alela znatno učestalija u bolesnica s PCOS-om kao i da bi pretilost u međudjelovanju s III/III *INS* VNTR-genotipom mogla biti predisponirajući čimbenik za razvoj PCOS-a (86).

1.7.4. Gen *INSR*

Inzulinski receptor je heterotetrameričkiglikoprotein. Sastoji se od dviju α i dviju β podjedinica i kodiran je *INSR*-genom. Gen, sastavljen od 22 egzona, lociran je na 19 p13.3 – p13.2 kromosoma (87). Mutacije u egzonima 17 – 21 povezane su s inzulinskom

rezistencijom i hiperinzulinemijom. Upravo ta regija kodira tirozin-kinazu receptora za inzulin (88). Polimorfizam koji uključuje supstituciju C u T u *INSR*-genu odnosno His 1058 C/T u egzonu 17 pokazao se znatno povezan s PCOS-om u nekoliko dosadašnjih studija u različitim populacijama (58, 89-92). Prepostavljeni mehanizam u podlozi ove povezanosti jest promijenjena autofosforilacija inzulinskog receptora u nosioca ovoga polimorfizma (41, 58).

1.7.5. Gen *IRS-1*

Supstrat za inzulinski receptor (IRS-1 – engl. *Insulin Receptor Substrate*) prvi je supstrat inzulinskog receptora u inzulinskom signalnom putu. Gen *IRS-1* nalazi se na lokaciji 2q36 (59). Aktivacija inzulinskog receptora zahtijeva autofosforilaciju β-podjedinice, što aktivira tirozin-kinazu. Tirozin-kinaza forforilira supstrate za inzulinski receptor (IRS-1 i IRS-2) čime se aktiviraju putevi odgovorni za metaboličku i mitogenu aktivnost inzulina. Ako je IRS-1 nefunkcionalan onda IRS-2 postaje glavni glasnik unutarstaničnoga prijenosa inzulinskog signala, što zahtijeva veću koncentraciju inzulina za njegovu aktivaciju (47). Najčešća polimorfna varijanta je promjena glicina u arginin u kodonu 972 (Gly792Arg) (93, 94). Smatra se da su ove genotipske varijante povezane s nedostatnim prijenosom signala od strane IRS-1 zbog čega izostaje unos glukoze u mišiće i stanice masnoga tkiva (94–96). Nosioci ovoga polimorfizma imaju dokazano povišeni rizik za šećernu bolest tipa 2 (97). Dilek i sur. pokazali su veću učestalost Gly792Arg-polimorfizma *IRS-1* gena u bolesnica s PCOS-om u Turskoj (93). U studijama El Mkadema i Viluendasa (95, 98) pokazano je da nosioci Gly792Arg-polimorfizma imaju veći ITM, inzulinsku rezistenciju i povišene vrijednosti inzulina na tašte u odnosu na bolesnice s normalnim ITM-om i u odnosu na kontrolnu skupinu (93).

1.7.6. Gen *PPAR-γ*

PPAR-γ *(*engl. *Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma*) je transkripcijski čimbenik koji sudjeluje u adipogenezi, energijskom metabolizmu i služi kao funkcionalni receptor za novu generaciju inzulin-senzitirajućih lijekova – tiazolidinediona (99). PPAR-γ nuklearni receptor nalazimo u teka-stanicama jajnika (100). PPAR-γ agonisti povisuju aktivnost MAP- kinaze (engl. *Mitogen-Activated Protein, MAP*) u na inzulin osjetljivim tkivima i smanjuju androgeni odgovor na inzulin u teka-stanicama (100). Točan mehanizam kojim PPAR-γ agonisti poboljšavaju *in vitro* aktivnost inzulina u teka-stanicama još je uvijek nepoznat. Ulažu se znatni napori u otkrivanje ovoga mehanizma jer bi ovi nalazi mogli pridonijeti popravku defekta djelovanja inzulina u bolesnica s PCOS-om (40).

Gen za PPAR-γ nalazi se na lokaciji 3p25 na 3 kromosomu (101). Gen je kandidat za regulaciju metabolizma masnoga tkiva odnosno za razvoj pretilosti i dijabetesa (47). Najčešća poliformna varijanta ovoga gena je supstitucija C u A nukleotide u egzonu 2 koja rezultira promjenom aminokiseline Pro u Ala u kodonu 12. Pro12Ala-polimorfizam povezan je s nižim stupnjem inzulinske rezistencije, povišenim klirensom inzulina te smanjenim rizikom za šećernu bolest tipa 2 (60).

Više je studija pokazalo da su bolesnice s PCOS-om s Pro/Ala-alelima osjetljivije na inzulin od onih s Pro/Pro te imaju manje izraženi hirzutizam (47, 60, 102–105). Prema istraživanju Yilmaza i sur. prvi srodnici bolesnica s PCOS-om imaju znatno manju učestalost Pro/Ala-alela, ali i da nosioci Pro/Ala-alela imanju manje izraženu inzulinsku rezistenciju od onih s Pro/Pro-alelima (105).

2. CILJEVI, HIPOTEZA I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti jesu li genski polimorfizmi sljedećih gena kandidata:

- mikrosatelitni polimorfizam $(CAG)_n$ u egzonu 1 gena *AR*,
- mikrosatelitni polimorfizam $(TAAAA)_n$ u promotoru gena *SHBG*,
- polimorfizam jedne baze Asp327Asn u egzonu 8 gena *SHBG*,
- minisatelitni polimorfizam u promotoru gena *INS,*
- polimorfizam jedne baze C/T u kodonu His 1058 gena *INSR,*
- polimorfizam jedne baze Gly792Arg gena *IRS-1,*
- polimorfizam jedne baze Pro12Ala gena *PPAR-γ*,

povezani s razvojem PCOS-a, odnosno, jesu li povezani s različitim kliničkim i biokemijskim značajkama ovoga sindroma.

Pokušali smo na komparativno impresivnom broju etnički ujednačenih ispitanica pridonijeti rasvjetljavanju složene i nedovoljno poznate genske podloge sindroma policističnih jajnika. Buduće genetičke informacije otvorit će put rješavanju enigme patogeneze PCOS-a i imat će velik utjecaj na usmjereniji terapijski pristup bolesnicama s PCOS-om.

Pretpostavke ovog istraživanja bile su sljedeće:

1. Prisutnost mikrosatelitnog polimorfizma $(CAG)_n$ u egzonu 1 gena *AR* čimbenik je rizika za razvoj PCOS-a i utječe na razinu androgena u serumu. Bolesnice s PCOS-om i s hiperandrogenizmom, ali bez hiperandrogenemije imaju manji broj CAG_n-ponavljanja u genu *AR*.
2. Prisutnost mikrosatelitnog polimorfizma $(TAAAA)_n$ u promotoru gena *SHBG* utječe na razvoj PCOS-a. Vrijednosti SHBG-a u serumu povezane su s brojem $(TAAAA)_n$-ponavljanja u promotorskoj regiji gena *SHBG*.

3. Asn-327 alel gena *SHBG* povezan je s vrijednostima SHBG-a u serumu. Prisutnost ovog alela u bolesnica s PCOS-om utječe na razinu slobodnih androgena u serumu.

4. VNTR *INS* III. kategorije povezani su s nastankom PCOS-a. U bolesnica s PCOS-om polimorfizam VNTR-a u promotoru gena *INS* utječe na koncentracije inzulina u serumu, određenog na tašte.

5. Polimorfizam jedne baze C/T u kodonu His 1058 tirozin-kinazne domene *INSR*-a povezan je s razvojem PCOS-a.

6. Polimorfizam jedne baze Gly972Arg gena *IRS-1* povezan je s razvojem PCOS-a. Ovaj polimorfizam utječe na inzulinsku rezistenciju i vrijednosti inzulina na tašte u bolesnica s PCOS-om.

7. Polimorfizam jedne baze Pro12Ala u genu *PPAR-γ* povezan je sa stupnjem inzulinske rezistencije te vrijednostima inzulina na tašte u bolesnica s PCOS-om.

3. ISPITANICE, MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanice

U istraživanu smo skupinu uključili 214 žena u dobi od 25,9 ± 5,2 godine u kojih smo postavili dijagnozu PCOS-a prema Rotterdamskim kriterijima (6, 7).

Poremećaje menstruacijskoga ciklusa definirali smo kao prisutnost amenoreje ili oligomenoreje. Hiperandrogenizam smo procjenjivali na temelju prisutnoga hirzutizma i/ili na temelju povišenih vrijednosti androgena (ukT, slT, androstendiona, DHEAS). Normalne granice navedenih androgena prikazane su u tablici 3. Hirzutizam smo definirali Ferriman-Gallweyovim indeksom većim od 8 koji smo dodatno podijelili u tri kategorije: blagi (FG 8 – 9), umjereni (FG 10 – 14) i teški (FG > 15) (16). Težinu akni podijelili smo u tri skupine: blage (*acne comedonica*), umjerene (*acne papulopustulosa*) i teške (*acne conglobata*) (20). Druge bolesti koje imitiraju PCOS isključili smo mjerenjem serumskih bazalnih vrijednosti 17-hidroksiprogesterona (17-OHP), prolaktina (PRL) i hormona koji stimulira štitnjaču (TSH).

Tablica 3. Normalni rasponi vrijednosti androgena u žena

Hormon	Normalni raspon
ukupni testosteron (nmol/L)	0,2 – 2,5
slobodni testosteron (pmol/L)	3,5 – 30
androstendion (nmol/L)	1 – 12
DHEAS (μmol/L)	2 – 10

U kontrolnu skupinu uključili smo 209 žena u dobi od 28,7 ± 4,6 godina, koje su bile u obradbi radi planiranoga postupka izvantjelesne oplodnje zbog muške neplodnosti. U ovu skupinu uključene su žene koje nisu imale poremećaj ciklusa, bez kliničkih ili biokemijskih znakova hiperandrogenizma i bez ultrazvučnog nalaza policističnih jajnika. Nijedna ispitanica u kontrolnoj skupini nije imala endokrinološki poremećaj ili autoimunosnu bolest kao ni ginekološke operacije u anamnezi.

Podatci o obiteljskoj, zdravstvenoj, reprodukcijskoj i ginekološkoj anamnezi dobiveni su u objema skupinama unaprijed dizajniranim upitnikom.

Sve su ispitanice uključene u studiju nakon redovita pregleda u Poliklinici za humanu reprodukciju Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a i Medicinskoga fakulteta u Zagrebu u razdoblju od listopada 2007. do prosinca 2009. godine. Prije uključenja u studiju svaka je ispitanica potpisala privolu o sudjelovanju. Indeks tjelesne mase (ITM) je izračunan kao masa/visina^2 (kg/m^2). Izmjeren je omjer struka i bokova (WHR, engl. *Waist to Hip Ratio*). Ultrazvučna dijagnoza policističnih jajnika postavljena je na temelju Rotterdamskih kriterija (6, 7). Sve su ispitanice kavkaskoga podrijetla i nisu međusobno u rodu.

Studija je odobrena od strane Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod brojem 04-1116-2006.

3.2. Biokemijske analize

Uzorci krvi za biokemijske analize vađeni su svim ispitanicama u ranoj folikulinskoj fazi spontanoga ili progesteronom induciranoga menstruacijskog ciklusa (3. – 5. dan) na tašte. Iz periferne krvi određivali smo: luteinizirajući hormon (LH), folikulo-stimulirajući hormon (FSH), ukT, androstendion, DHEAS, SHBG, glukozu i inzulin.

Serumske vrijednosti LH-a, FSH-a, i ukT-a određivane su kemoluminiscentnom imunometrijskom reakcijom s LH-Vitros, FSH-Vitros i Testosterone-Vitros (*Ortho Clinical Diagnostics, Johnson&Johnson*, Rochester, New York, SAD). Serumske vrijednosti SHBG-a, DHEAS-a, i androstendiona određivane su kemoluminiscentnom imunometrijskom reakcijom sa SHBG-Immulite, DHEAS-Immulite i Androstendion-Immulite (*Siemens Healthcare Diagnostics Inc.*, Deerfield, Illinois, SAD). Koeficijenti varijacije unutar reakcija i između reakcija bili su između 1,5 i 7,9 %. Razina glukoze u plazmi određivana je automatiziranom referentnom metodom s heksokinazom (*Siemens Dade* Behring, SAD), a vrijednosti inzulina u serumu kemoluminiscentnom imunometrijskom reakcijom s Insulin-Immulite (*Siemens Healthcare Diagnostics Inc.,* Deerfield, Illinois, SAD).

Serumske koncentracije slobodnoga testosterona izračunane su prema formuli: (ukupni testosteron × 1.000)/(SHBG – ukupni testosteron + 23,32) (22). Inzulinska osjetljivost izračunana je HOMA-IR prema formuli: (inzulin (mU/L) × glukoza (mmol/L))/ 22,5) (106). Inzulinsku rezistenciju definirali smo kao HOMA-IR ≥ 2,5 (107).

Navedene biokemijske analize provedene su na Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a i Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.3 Molekularnogenetičke analize

Uzorci pune krvi za izolaciju DNA vađeni su istoga dana kad i uzorci za biokemijske analize, ali bi se po vađenju smrzavali na –20 ºC. Uzorci su unutar dva tjedna transportirani u Zavod za genetiku Klinike za ginekologiju i opstetriciju Sveučilišnoga Medicinskog Centra u Ljubljani, Slovenija, gdje su nakon izolacije DNA pohranjivani do provedene molekularnogenetičke analize.

3.3.1. Izolacija genomske DNA

Uzorci pune krvi za izolaciju genomske DNA prikupljani su u epruvete volumena 10 mL s dodanim antikoagulansom EDTA. Genomsku DNA izolirali smo iz leukocita periferne krvi. Za izolaciju genomske DNA primijenjena je standardna metoda (108) za koju je dostupan komercijalni komplet *FlexiGene DNA kit 250* (*Qiagen GmbH*, Hilden, Njemačka). Izolacija je provedena prema protokolu preporučenom od strane proizvođača.

Izoliranu DNA iz uzoraka svih ispitanica rabili smo za molekularnogenetičke analize odabranih genskih polimorfizama.

3.3.2. Molekularnogenetička analiza mikrosatelitnih polimorfizama $(CAG)_n$ *AR* i $(TAAAA)_n$ *SHBG*

Za određivanje broja ponavljanja osnovnoga motiva mikrosatelitnih polimorfizama u genu za *AR* i *SHBG* koristili smo se metodom PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction* – lančana reakcija polimerazom) te elektroforezom na komercijalno dostupnim podlogama *Spreadex Mini gels* (*Elchrom Scientific*, Cham, Švicarska). Broj ponavljanja osnovnoga motiva određivali smo prema duljini DNA-fragmenata koje smo prethodno odredili izravnim sekvencioniranjem odabranih PCR-produkata različite duljine.

3.3.2.1. Analiza mikrosatelitnoga polimorfizma $(CAG)_n$ u genu AR

Za PCR-analizu mikrosatelitnoga polimorfizma $(CAG)_n$ u genu *AR*, koristili smo se sljedećim parom početnica:

F: 5'-TCC AGA ATC TGT TCC AGA GCG TGC-3'

R: 5'-GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT CAT-3' (109)

Reakcijska otopina za pojedinačni uzorak DNA ukupnoga volumena 10 μL sadržavala je sljedeće komponente u navedenim ukupnim koncentracijama, odnosno količinama: 100 ng genomske DNA, 0,4 μM svake početnice, 0,2 mm svakog dNTP-a, 1 × pufer za PCR (*Perkin Elmer, Applied Biosystems*, Foster City, Kalifornija, SAD), 1,5 mM $MgCl_2$ i 1 jedinica enzima DNK *AmpliTaq Gold*^{TM} polimeraze (*Perkin Elmer, Applied Biosystems*, Foster City, Kalifornija, SAD).

Uvjeti izvođenja PCR-a bili su sljedeći: početna denaturacija 10 minuta na 95 °C, potom 30 ciklusa s denaturacijom od 1 minute na 94 °C, 2 minute spajanja početnica na 59 °C i 90 sekunda produljenja na novonastalim lancima DNA i na kraju 10-minutno konačno produljenje umnoženih sljedova DNA na 72 °C.

Elektroforeza na gelu *Spreadex*^{TM}*EL 800 Mini* trajala je 150 min. Unutarnji standard veličine za precizno određivanje duljine alela $(CAG)_n$ *AR*, sastojao se od dvaju DNA-fragmenata duljine 285 bp i 294 bp, što odgovara broju CAG-ponavljanja 21 i 24.

3.3.2.2. Analiza mikrosatelitnoga polimorfizma $(TAAAA)_n$ u genu SHBG

Za PCR-analizu mikrosatelitnoga polimorfizma $(TAAAA)_n$ u genu *SHBG*, primjenjivali smo sljedeći par početnica:

F: 5'-GAA CTC GAG AGG CAG AGG CAG CAG TGA-3'

R: 5'-AGA AAT CAC CCA CTC CCT GA-3' (74)

Reakcijska otopina za pojedinačni uzorak DNA ukupnoga volumena 15 μL sadržavala je sljedeće komponente u navedenim ukupnim koncentracijama, odnosno količinama: 100 ng genomske DNA, 0,2 μM svake početnice, 0,2 mm svake dNTP-a, 1× pufer za PCR (*Perkin Elmer, Applied Biosystems*, Foster City, Kalifornija, SAD), 1,5 mm $MgCl^2$ i 1 jedinica enzima

DNK *AmpliTaq Gold*^{TM} polimeraze (*Perkin Elmer, Applied Biosystems*, Foster City, Kalifornija, SAD).

Uvjeti izvođenja PCR-a bili su sljedeći: početna denaturacija 10 minuta na 95 °C, potom 30 ciklusa s 45 sekunda kontinuirane denaturacije na 94 °C, 45 sekunda spajanja početnica na 63 °C i 1-minutno produljenje na novonastalim lancima DNA i na kraju 7-minutno konačno produljenje umnoženih sljedova DNA na 72 °C.

Elektroforeza na gelu *Spreadex*^{TM}*EL 800 Mini* trajala je 141 min. Unutarnji standard veličine za precizno određivanje duljine alela $(TAAAA)_n$ *SHBG* sastojao se od dvaju DNA fragmenata duljine 133 bp i 138 bp (engl. *base pair*, parovi baza), što odgovara broju TAAAA ponavljanja 6 i 7.

Različito duge PCR-produkte razdvajali smo elektroforezom na komercijalno dostupnim podlogama *Spreadex*^{TM} (*Elchrom Scientific*, Cham, Švicarska), na uređaju za elektroforezu *SEA 2000* (*Elchrom Scientific*, Cham, Švicarska) s 0,6 mM TAE-pufera na temperaturi od 55 °C i naponu od 120 V. Na gel smo nanijeli 1 µL reakcijske otopine s PCR-produktima *AR* ili 2 µL reakcijske otopine PCR-produkta *SHBG* te 4 µL pufera za nanošenje (*Elchrom Scientific*, Cham, Švicarska) razrijeđenoga s destiliranom vodom u omjeru 1 + 3, odnosno 3 µL pufera za nanošenje razrijeđenoga s destiliranom vodom u omjeru 1 + 2. Nakon završene elektroforeze gel je bojen bojom *SyberGold* (*Amersham Pharmacia Biotech*, Piscataway, NJ) 35 min, a potom je uz stalnu trešnju uronjen u otopinu za odbojivanje nespecifično vezane boje (*Elchrom Scientific*, Cham, Švicarska). Rezultati elektroforeze različito dugih PCR-produkata provjereni su na uređaju *ChemiGenius Bio Imaging System* (*Syngene*, Cambridge, Velika Britanija), a slike gelova za elektroforezu slikane su računalnim programom *GeneScan* (*Syngene*, Cambridge, UK) za automatsko slikanje. Za mjerenje duljine fragmenata, koristili smo se računalnim programom *GeneTools* (*Syngene*, Cambridge, UK) i veličinom fragmenata određivali smo u odnosu na biljeg duljine M3 (*Elchrom Scientific*, Cham, Švicarska) i u odnosu na DNA-fragmente poznate veličine i broja ponavljanja, koji su bili unutarnji standard.

3.3.3. Molekularnogenetička analiza minisatelitnoga polimorfizma VNTR-a u genu *INS*

Minisatelitni polimorfizam u promotoru gena *INS*, analizirali smo posredno analizirajući njegov surogatni biljeg, SNP-polimorfizam – 23*HphI* A > T u promotoru toga gena (poglavlje 3.3.4.), a potom PCR-analizom u realnom vremenu (engl. *real time PCR*).

U europskoj populaciji pokazano je da je – 23 T alel u potpunoj neravnoteži vezanosti gena s I kategorijom *INS* VNTR-alela dok je – 23 A u potpunoj neravnoteži vezanosti gena s III. kategorijom *INS* VNTR-alela (110).

3.3.4. Molekularnogenetička analiza polimorfizama jedne baze

Za molekularnogenetičke analize polimorfizama jedne baze proveli smo PCR-alelnu diskriminaciju u stvarnome vremenu koja je izvedena na uređaju *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, Foster City, SAD). Iz baze *Taqman SNP Genotyping Assays* (*Applied Biosystems*, Foster City, SAD) naručene su sljedeće početnice i probe:

- Asp327Asn gena *SHBG* (rs 6259) – C__11955739_10 (AB Assay ID);
- Pro12Ala gena *PPAR-y-I (*rs1801282) – C __1129864_10 (AB Assay ID);
- Gly972Arg gena *IRS-1* (rs1801278) – C__2384392_20 (AB Assay ID);
- C10923T gena INSR (rs1799817) – C__8356128_1_ (AB Assay ID).

Početnicama i probama koristili smo se za genotipizaciju u skladu s preporučenim protokolom i navodima proizvođača (*Applied Biosystems*, Foster City, SAD). Molekularnogenetičku analizu provodili smo u reakcijskoj smjesi u ukupnom volumenu 5 μL, koja se sastojala od: *TaqMan Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, SAD) uz DNA-polimerazu *AmpliTaq Gold* s 5' nukleaznom aktivnošću, *TaqMan SNP Genotyping Assay* (*Applied Biosystems*, Foster City, SAD) te 25 ng genomske DNA. Reakcijski su uvjeti u svim analizama bili jednaki, nakon 2 minute inkubacije na 50 °C slijedila je 10-minutna aktivacija DNA-polimeraze na 95 °C, a potom 45 ciklusa po 15 sekunda denaturacije na 92 °C te 1 minuta spajanja početnica odnosno produljenja umnoženih sljedova DNA na 60 °C (*TaqMan Universal PCR protocol; Applied Biosystems*, Foster City, SAD). Po završetku reakcije dobiveni rezultati analizirani su uz pomoć *SDS (Sequence*

Detection Systems) Automation Controller Software v2.3 8 (*Applied Biosystems*, Foster City, SAD).

Za alelnu diskriminaciju polimorfizma – 23*HphI A > T* u genu *INS* korištena je otopina *Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay* (*Applied Biosystems*, Foster City, California, SAD) koja je sadržavala neoznačene ciljno-specifične početnice (engl. *target specific primers*):

F: 5'-GGG CAC CTG GCC TTC AG-3'

R: 5'-CCA TGG CAG AAG GAC AGT GA-3'

te dvije bojom *TaqMan® MGB* označene sonde:

– sonda označena bojom *VIC®* za detekciju *HphI* T-alela

5'-CCT GCC TGT CTC CCA GA-3' i

– sonda označena bojom 6-FAM™ za detekciju *HphI* A-alela

5'-CTG CCT GTC ACC CAG A-3'.

3.4. Statistička obradba

Kategorijske varijable opisali smo postotkom, a kontinuirane aritmetičkom sredinom ± standardnom devijacijom za varijable koje su distribuirane po normalnoj razdiobi. U slučaju odstupanja od normalne razdiobe kontinuirane varijable opisane su medijanom i interkvartilnim rasponom jer su spomenute mjere lokacije i raspršenosti otpornije na postojanje neobičnih podataka (*outlier*) u populaciji. Za usporedbu skupina (testiranje nezavisnosti) s kategorijskim varijablama primijenjen je Pearsonov χ^2-test dok je za usporedbu kontinuiranih varijabli primijenjen parametrijski Studentov T-test odnosno neparametrijski Mann-Whitneyev – U-test. Pearsonov test korelacije primijenjen je u procjenama linearnih povezanosti među varijablama. Parcijalna korelacija korištena je kako bi se isključio utjecaj pojedine varijable na povezanost ostalih. Hardy-Weinbergova ravnoteža između očekivanih i promatranih frekvencija testirana je χ^2-testom.

Genotipske analize mikrosatelitnih polimorfizama provođene su na dva načina. Najprije je izračunana srednja vrijednost zbroja ponavljanja obaju alela (CAG_{SV}, $SHBG_{SV}$) za pojedini genotip svake ispitanice. Time je genotip analiziran kao kontinuirana varijabla. Potom je analizom broja ponavljanja svih alela istraživane populacije (PCOS 2N = 428 +

kontrola 2N = 418; ukupno 846) izračunan medijan broja ponavljanja za našu istraživanu populaciju (CAG_M, $SHBG_M$). U drugom koraku formirali smo kategorijske varijable. Srednja vrijednost zbroja ponavljanja obaju alela uspoređivana je s medijanom broja ponavljanja čitave istraživane populacije čime je dobila atribut kratak ili dug genotip. S obzirom na to da se gen *AR* nalazi na X-kromosomu zbog nepravilne inaktivacije X-kromosoma, koja može utjecati na rezultate, iz analize su izdvojeni heterozigotni genotipi s kombinacijom kratkog i dugog alela.

Učestalost polimorfizama jedne baze prikazana je postotcima. Potom su genotipovi podijeljeni u dvije kategorije: homozigoti za divlji tip alela (1. kategorija) i heterozigoti + homozigoti za polimorfni alel (2. kategorija).

Povezanost genotipova s PCOS-om istraživana je metodom logističke regresije, a utjecaj pojedinoga genotipa na različite kliničke, biokemijske i hormonalne parametre, višestrukom linearnom regresijom.

Za utvrđivanje razlika između više od dviju skupina ispitanica provedena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) u slučaju normalne razdiobe, odnosno, neparametrijski Kruskal-Wallisov test za nenormalnu razdiobu.

Sve statističke analize provedene su uz pomoć računalnog programa za statističku analizu *SPSS for Windows, verzija 17.0* (*Statistical Package for the Social Sciences Inc.*, Illinois, SAD). Za sve testove statistička značajnost prihvaćena je uz $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Kliničke i biokemijske značajke ispitanica

Usporedbom kliničkih podataka pokazali smo da su bolesnice s PCOS-om imale znatno viši ITM od kontrolne skupine, iako je u objema skupinama većina ispitanica imala normalnu tjelesnu masu (79,4 % vs. 90,9 %). Gotovo 80 % bolesnica s PCOS-om imalo je hirzutizam, a 51,6 % akne. Učestalost pojedinih stupnjeva akni i hirzutizma, kao i poremećaja ciklusa navedeni su u tablici 4.

Tablica 4. Usporedba kliničkih značajki između bolesnica s PCOS-om i kontrolne skupine

	PCOS (N = 214)	Kontrola (N = 209)	*P* – vrijednost[1]
dob (godine)	25,9 ± 5,2	28,7 ± 4,6	**< 0,001**
ITM (kg/m^2)	23,1 ± 3,9	22,2 ± 3,1	**0,013**
ITM < 25 (kg/m^2) (%)	79,4	90,9	**0,001**
omjer struka i bokova	0,78 ± 0,1	0,79 ± 0,1	0,941
hirzutizam (%)	76,9	11,1	**< 0,001**
FG 8–9 (%)	24,2	5,1	**< 0,001**
FG 10–14 (%)	36,3	6,1	**< 0,001**
FG > 15 (%)	16,5	0	**< 0,001**
FG – ukupni broj	11,8 ± 3,6	5,37 ± 2,0	**< 0,001**
akne (%)	51,6	18,2	**< 0,001**
blage (%)	27,5	9,1	**< 0,001**
umjerene (%)	19,8	8,1	**< 0,001**
teške (%)	2,4	1	**< 0,001**
Menstruacijski ciklus (%)			
uredan (%)	9,9	100	**< 0,001**
oligomenoreja (%)	67	0	**< 0,001**
amenoreja (%)	24,2	0	**< 0,001**
UZV-nalaz PCO (%)	96,7	0	**< 0,001**

[1]Studentov T-test za kontinuirane varijable i χ^2 test za kategorijske varijable

Očekivano smo zabilježili znatno više serumske vrijednosti LH-a, ukT-a, slT-a, inzulina te HOMA-IR dok su serumske vrijednosti SHBG-a i FSH-a bile znatno niže nego u kontrolnoj skupini. Serumske vrijednosti glukoze nisu se znatno razlikovale među skupinama. Rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Razlike između koncentracija različitih hormona i metabolita PCOS-a i kontrolne skupine

	PCOS (N = 214)	Kontrola (N = 209)	*P*-vrijednost[1]
FSH (IU/L)	4,1 ± 2,0	5,1 ± 1,4	**< 0,001**
LH (IU/L)	9,1 ± 5,9	3,1 ± 1,2	**< 0,001**
ukT (nmol/L)	2,5 ± 0,9	1,2 ± 0,4	**< 0,001**
[2]ukT > 2,0 (nmol/L) (%)	62,1	3,8	**< 0,001**
ukT > 3,0 (nmol/L) (%)	29,4	0	**< 0,001**
slT (pmol/L)	45,8 ± 27,2	13,54 ± 5,3	**< 0,001**
slT > 26,0 (pmol/L) (%)	70,6	1,4	**< 0,001**
A (nmol/L)	11,5 ± 5,2	7,6 ± 2,5	**< 0,001**
DHEA-S (μmol/L)	6,8 ± 2,9	5,0 ± 1,9	**< 0,001**
SHBG (nmol/L)	41,0 ± 19,5	64,0 ± 20,4	**< 0,001**
glukoza (mmol/L)	4,3 ± 0,6	4,3 ± 0,5	0,910
inzulin (mIU/L)	11,2 ± 7,8	7,0 ± 2,3	**< 0,001**
GIR	10,2 ± 6,4	12,7 ± 5,9	**< 0,001**
HOMA-IR	2,2 ± 2,6	1,3 ± 0,5	**< 0,001**
HOMA-IR > 2,5 (%)	18,2	2,4	**< 0,001**
HOMA-IR > 2,5 i ITM < 25 kg/m^2	12,4	2,6	**< 0,001**
HOMA-IR > 2,5 i ITM > 25 kg/m^2	40,9	0	**< 0,001**

[1]Studentov T-test kontinuirane varijable i χ^2 test za kategorijske varijable; [2]95. percentila za kontrolnu populaciju

Povišene serumske vrijednosti ukT-a nalazimo u 62,1 % bolesnica u odnosu na 3,8 % u kontrolnoj skupini. Vrijednosti ostalih androgena (ukT, A i DHEAS) znatno su povišene u odnosu na kontrolnu skupinu. Inzulinsku rezistenciju nalazimo u 18,2 % bolesnica te 2,4 % ispitanica u kontrolnoj skupini što je prikazano u tablici 5.

U skupini bolesnica s PCOS-om, ITM značajno pozitivno korelira s razinom inzulina u serumu (R = 0,181; P = 0,008) i HOMA-IR (R = 0,186, P = 0,006) dok nema značajne korelacije sa serumskom razinom SHBG-a (R = - 0,022, P = 0,750).

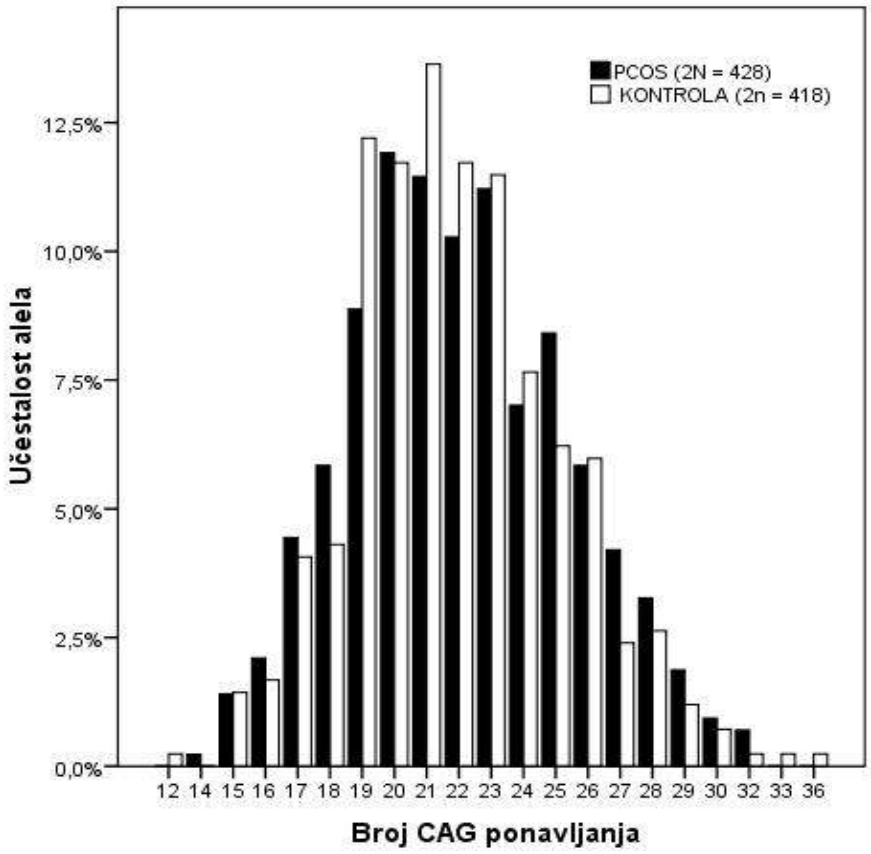
4.2. Molekularnogenetičke analize

Svi analizirani polimorfizmi bili su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži u objema istraživanim skupinama. Broj ispitanica u analizama polimorfizama jedne baze gena za *SHBG, INSR, IRS-1* i *PPAR-γ* bio je manji zbog slabe PCR-reakcije.

4.2.1. Mikrosatelitni polimorfizam $(CAG)_n$ u egzonu 1 gena *AR*

4.2.1.1. Povezanost $(CAG)_n$ AR s PCOS-om

Raspodjela alela s različitim brojem CAG-ponavljanja za PCOS i kontrolnu skupinu ispitanica prikazana je na slici 3.



Slika 3. Raspodjela alela $(CAG)_n$ *AR* u bolesnica s PCOS-om i u kontrolnoj skupini.

Nije nađena značajna razlika u raspodjeli alela $(CAG)_n$ *AR* između istraživane (22,1 ± 3,4; 2N = 426 alela) i kontrolne (21,9 ± 3,2; 2N = 418 alela) skupine ispitanica ($P = 0,286$, χ^2-test). Medijan broja ponavljanja svih alela (CAG_M) iznosio je 22. Razlike u učestalosti raspodjele alela $(CAG)_n$ *AR* između PCOS-a i kontrolne skupine u odnosu na CAG_M

prikazane su u tablici 6., zasebno za ukupni broj alela (2N), CAG_{sv} te CAG_{sv} s isključenim heterozigotima za ekstremnu kombinaciju alela.

Tablica 6. Raspodjela (%) bolesnica s PCOS-om i kontrolne skupine u odnosu na CAG_M

	Ukupni broj CAG-alela[a]		CAG_{sv}[b]		CAG_{sv} s isključenim heterozigotima[c]	
Raspon	PCOS (2n = 428)	Kontrola (2n = 418)	PCOS (n = 214)	Kontrola (n = 209)	PCOS (n = 116)	Kontrola (n = 124)
≤ 22	56,5	61,0	55,6	58,9	61,2	68,5
> 22	43,5	39,0	44,4	41,1	38,8	31,5

[a]$\chi^2 = 1{,}74$, $P = 0{,}187$; [b]$\chi^2 = 0{,}00$, $P = 0{,}99$; [c]$\chi^2 = 1{,}42$, $P = 0{,}233$

Raspodjela CAG-ponavljanja nije bila znatno različita između ispitivane i kontrolne skupine, iako je u bolesnica s PCOS-om prisutan trend postojanja duljih $(CAG)_n$ *AR*-alela u odnosu na kontrolnu skupinu. Obje skupine ispitanica imale su veću frekvenciju CAG_{sv}-ponavljanja u polimorfnom rasponu ispod CAG_M što je prikazano u tablici 6.

Logističkom regresijom koja je uključivala PCOS-status (šifriran kao PCOS = 0, kontrola = 1) kao ovisnu varijablu i CAG_{sv} kao neovisnu, ITM i dob kao kovarijante pokazali smo da broj CAG-ponavljanja nije značajan pretkazatelj nastanka PCOS-a ($B = -0{,}038$, $P = 0{,}379$).

4.2.1.2. Povezanost $(CAG)_n$ AR-a s kliničkim i biokemijskim značajkama PCOS-a

Nismo našli znatniju razliku u kliničkoj slici ili vrijednostima biokemijskih parametara između skupine bolesnica s PCOS-om s kratkim i dugim genotipom osim u razini ukT-a koji je viši u skupini s dugim genotipom ($P = 0{,}019$) što je prikazano u tablici 7.

Tablica 7. Razlike u kliničkim i biokemijskim parametrima ovisno o duljini $(CAG)_n$ *AR*-genotipa među bolesnicama s PCOS-om

	$(CAG)_n$ *AR*-genotip		
	kratki (N = 71)	dugi (N = 45)	*P*-vrijednost[1]
dob (godine)	26,9 ± 5,9	25,8 ± 5,9	0,328
ITM (kg/m^2)	23,4 ± 4,2	22,4 ± 3,2	0,153
omjer struka i bokova	0,76 ± 0,07	0,82 ± 0,1	0,055
FSH (IU/L)	3,8 ± 1,5	4,5 ± 2,9	0,157
LH (IU/L)	8,9 ± 6,1	9,3 ± 6,8	0,726
ukT (nmol/L)	2,2 ± 0,9	2,6 ± 1,0	**0,019**
slT (pmol/L)	40,1 ± 21,9	45,0 ± 23,3	0,255
A (nmol/L)	12,3 ± 6,0	10,2 ± 4,1	0,170
DHEAS (µmol/L)	7,0 ± 2,8	7,6 ± 2,4	0,469
SHBG (nmol/L)	41,3 ± 19,7	43,9 ± 17,2	0,453
HOMA-IR	2,0 ± 2,1	2,4 ± 2,9	0,410
pubarha (godine)	11,5 ± 1,7	10,7 ± 1,5	0,136
menarha (godine)	13,0 ± 1,6	12,5 ± 1,8	0,330
menstruacijski ciklus			
normalan (%)	10,8	7,7	0,747
oligomenoreja (%)	67,6	53,8	0,375
amenoreja (%)	21,6	38,5	0,234
Ferriman-Gallweyjev broj	9,82 ± 4,0	11,3 ± 4,7	0,135
hirzutizam	70,3	69,2	0,944
FG 8 – 9 (%)	25,5	30,8	
FG 10 – 14 (%)	23,8	15,4	0,303
FG > 15 (%)	21,0	23,1	
akne	45,9	61,5	0,333
blage (%)	24,3	46,2	
umjerene (%)	16,2	15,4	0,440
teške (%)	5,4	0	

[1]Studentov T-test kontinuirane varijable i χ^2 test za kategorijske varijable

4.2.1.3. Povezanost $(CAG)_n$ s kliničkim i biokemijskim znakovima povišenih androgena

Pearsonovim testom korelacije pokazana je znatna pozitivna korelacija između CAG_{sv} ponavljanja i ukT-a u skupini bolesnica s PCOS-om (N = 116, R = 0,225, P = 0,015). Pozitivna korelacija postoji i nakon prilagodbe za dob, ITM-a i HOMA-IR-a, što je prikazano u tablici 8. Model u koji su kao pretkazatelji uključeni CAG_{sv}, ITM, dob i HOMA-IR može objasniti 8,5 % varijabilnosti (prilagođeni R^2) u serumskim razinama ukT-a gdje je genetički parameter značajan pretkazatelj (P = 0,015) (tablica 8.). U kontrolnoj skupini opisana povezanost nije nađena Pearsonovim testom korelacije (N = 124, R = 0,039, P = 0,671).

Tablica 8. Model višestruke linearne regresije s ukT-om kao ovisnom varijablom

Varijabla	Standardizirani *B*-koeficijent	*P*-vrijednost
neprilagođeni model (R^2 = 0,048)		
CAG_{sv}	0,220	**0,019**
prilagođeni model (R^2 = 0,076)		
CAG_{sv}	0,215	**0,022**
dob	– 0,137	0,140
ITM	0,091	0,327
prilagođeni model (R^2 = 0,085)		
CAG_{sv}	0,231	**0,015**
dob	– 0,124	0,186
ITM	0,114	0,232
HOMA-IR	– 0,099	0,301

Utjecaj broja CAG-ponavljanja na težinu hirzutizma i akni ispitan je jednosmjernom analizom varijance, ali nije nađena značajna razlika (F = 1,12, P = 0,339 za hirzutizam, F = 1,35, P = 0,281 za akne). Utjecaj ukT-a na hirzutizam i akne, također nije značajan (F = 0,207, P = 0,813 za hirzutizam, F = 0,663, P = 0,520 za akne). CAG_{sv} i srednje vrijednosti ukT-a u različitim skupinama prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Povezanost hirzutizma i akni s brojem $(CAG)_n$ *AR*-ponavljanja i ukT-a

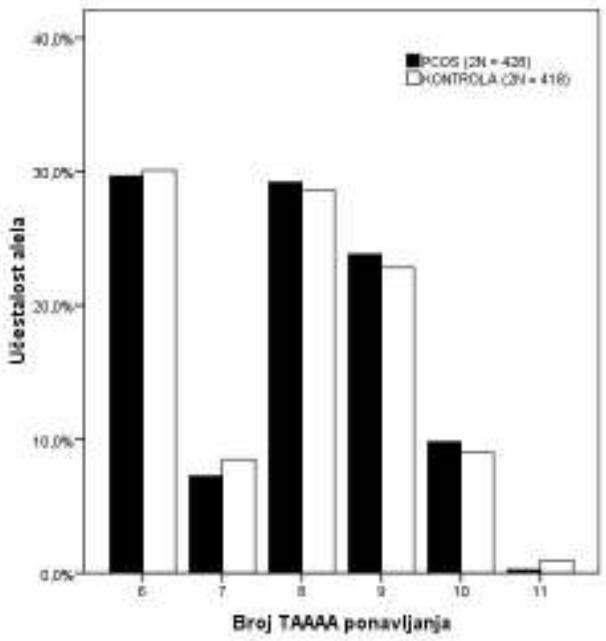
		CAG_{sv} [1]	ukT (nmol/L) [2]
Hirzutizam[a]			
	FG 8 – 9 (N = 28)	22,4 ± 3,1	2,2 ± 1,1
	FG 10 – 14 (N = 42)	20,7 ± 2,6	2,0 ± 0,8
	FG > 15 (N = 19)	21,9 ± 3,9	2,1 ± 1,1
Akne[b]			
	blage (N = 32)	22,7 ± 3,1	2,3 ± 1,0
	umjerene (N = 23)	21,2 ± 3,5	2,0 ± 0,8
	teške (N = 5)	19,3 ± 1,1	2,0 ± 1,8

[a1]F = 1,12, *P* = 0,339; [a2]F = 1,35, *P* = 0,281; [b1]F = 0,207, *P* = 0,813; [b2]F = 0,663, *P* = 0,520 (ANOVA)

4.2.2. Mikrosatelitni polimorfizam $(TAAAA)_n$ u promotoru gena *SHBG*

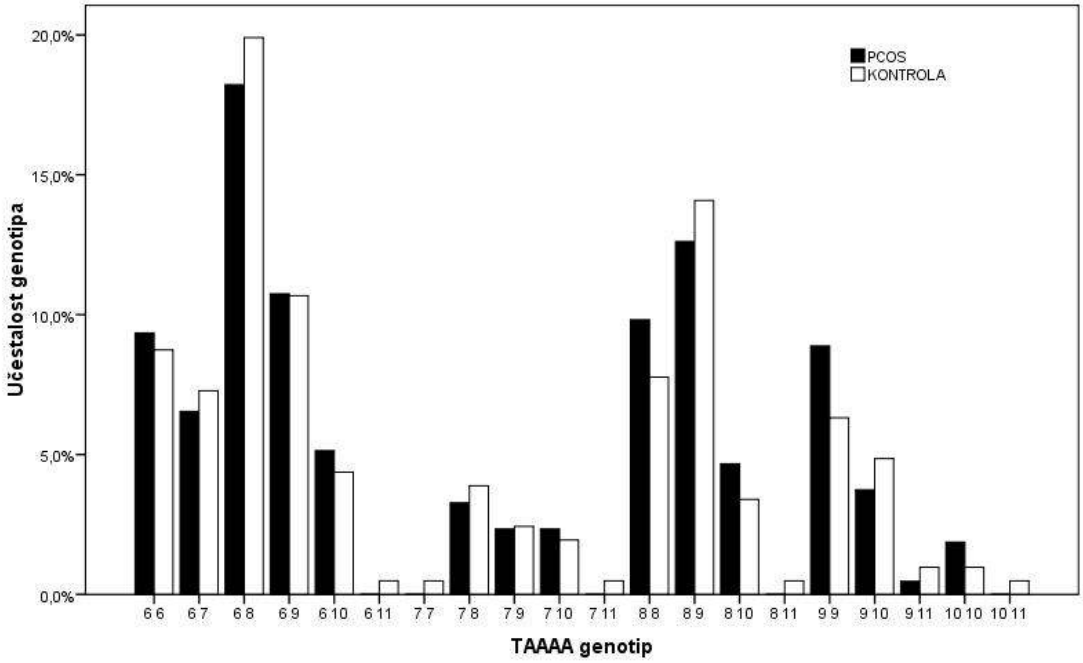
4.2.2.1. Povezanost $(TAAAA)_n$ gena SHBG s PCOS-om

U našoj istraživanoj populaciji pokazali smo šest $(TAAAA)_n$ alela u rasponu od 6 do 11 što je prikazano na slici 3. Najučestaliji aleli su aleli sa 6 (29,7 % PCOS vs. 30,1 % kontrolna skupina), 8 (29,2 % PCOS vs. 28,6 % kontrolna skupina) i 9 (23,8 % PCOS vs. 22,8 % kontrolna skupina) ponavljanja, ali njihova raspodjela kao i raspodjela svih alela nije bila znatno različita između PCOS-a i kontrolne skupine (P = 0,758, χ^2–test). Medijan broja ponavljanja svih alela $TAAAA_M$ iznosio je 8.



Slika 3. Raspodjela alela $(TAAAA)_n$ *SHBG* u bolesnica s PCOS-om i u kontrolnoj skupini.

Nađeni aleli sastavnica su 20 različitih genotipova koji su bili jednako raspoređeni između ispitivanih skupina, osim genotipova 6/11, 7/7, 7/11, 8/11, 10/11 koji su nađeni samo u kontrolnoj skupini (slika 4.).



Slika 4. Raspodjela $(TAAAA)_n$ *SHBG* genotipova između bolesnica s PCOS-om i kontrolne skupine.

Najprije smo analizirali $(TAAAA)_n$-genotip kao kategorijsku varijablu. Logističkom regresijom koja je uključivala PCOS-status (šifriran kao PCOS = 0, kontrola = 1) kao ovisnu varijablu i $(TAAAA)_n$-genotip (šifriranu kao kratki = 1, dugi = 2), ITM i dob kao kovarijante, pokazali smo da $(TAAAA)_n$-genotip nije značajan pretkazatelj nastanka PCOS-a. Prisutnost genotipa s dugim alelima povisuje vjerojatnost za PCOS, ali rezultat nije značajan (B = -0,049, P = 0,817).

4.2.2.2. Povezanost $(TAAAA)_n$ SHBG-a s biokemijskim i kliničkim značajkama PCOS-a

Razlike između kliničkih i biokemijskih parametara između bolesnica s PCOS-om s kratkim i dugim $(TAAAA)_n$ genotipom prikazana je u tablici 10.

Tablica 10. Razlike u kliničkim i biokemijskim značajkama bolesnica s PCOS-om s kratkim i dugim genotipom

	TAAAA-genotip PCOS-a			TAAAA-genotip kontrolna skupina		
	kratki (N = 103)	dugi (N = 111)	*P*-vrijednost[1]	kratki (N = 104)	dugi (N = 100)	*P*-vrijednost[1]
učestalost %	48,1	51,9	0,490	51,0	49,0	0,938
dob (godine)	26,3 ± 6,1	25,4 ± 5,8	0,268	28,7 ± 4,8	28,6 ± 4,5	0,913
BMI (kg/m^2)	23,2 ± 3,8	22,9 ± 4,1	0,589	22,1 ± 2,6	22,3 ± 3,6	0,761
omjer struka i bokova	0,79 ± 0.1	0,78 ± 0.8	0,300	0,78 ± 0.1	0,80 ± 0.1	0,323
FSH (IU/L)	3,9 ± 1,6	4,2 ± 2,3	0,349	4,9 ± 1,3	5,1 ± 1,3	0,184
LH (IU/)	8,6 ± 5,6	9,6 ± 6,2	0,236	3,1 ± 1,3	3,0 ± 1,0	0,354
ukT (nmol/L)	2,5 ± 1,1	2,5 ± 0,9	0,840	1,2 ± 0,5	1,2 ± 0,4	0,508
slT (pmol/L)	39,3 ± 18,2	51,6 ± 24,3	**< 0,001**	12,6 ± 5,0	14,5 ± 5,4	**0,011**
A (nmol/L)	11,2 ± 5,8	11,8 ± 4,4	0,623	7,4 ± 2,3	7,7 ± 2,7	0,462
DHEA-S (µmol/L)	6,7 ± 3,23	7,0 ± 2,6	0,608	4,8 ± 1,7	5,1 ± 2,1	0,425
SHBG (nmol/L)	48,9 ± 10,8	33,8 ± 10,4	**< 0,001**	68,8 ± 16,7	59,3 ± 12,9	**0,001**
HOMA-IR	2,3 ± 2,9	2,1 ± 1,8	0,743	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,5	0,834

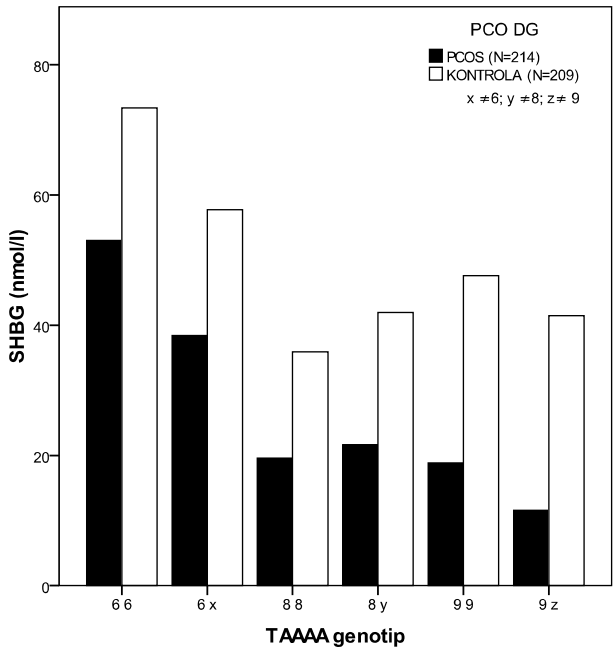
[1]Studentov T-test

Usporedbom u tablici 10. navedenih kliničkih i biokemijskih parametara pokazana je značajna razlika samo u serumskim razinama SHBG-a i slT-a, ali ovaj je nalaz bio neovisan o PCOS-statusu.

4.2.2.3. Povezanost $(TAAAA)_n$ SHBG-a sa serumskim vrijednostima SHBG-a

Pearsonovom analizom korelacije s $(TAAAA)_{SV}$ kao kontinuiranom varijablom, pokazali smo značajnu negativnu korelaciju između broja $(TAAAA)_{SV}$-ponavljanja i serumske koncentracije SHBG-a u objema skupinama ispitanica ($P < 0{,}001$). Negativna korelacija egzistira i nakon kontroliranja za dob, ITM i HOMA-IR (PCOS-skupina N = 214, $R = -0{,}467$, $P < 0{,}001$; kontrola N = 209, $R = -0{,}375$, $P < 0{,}001$; parcijalna korelacija).

Serumske razine SHBG-a značajno su niže u PCOS-u u odnosu na kontrolnu skupinu ako uspoređujemo homozigote i heterozigote za najučestalije TAAAA-alele: 6/6, 6/x, 8/8, 8/y, 9/9 i 9/z ($P = 0{,}018$, $P < 0{,}001$, $P = 0{,}024$, $P < 0{,}001$, $P < 0{,}001$, $P = 0{,}001$), što je prikazano na slici 5.



Slika 5. Serumske vrijednosti SHBG-a kod homozigotnih genotipova i nosioca najčešćih TAAAA-alela.

Analizom varijance pokazali smo značajnu razliku u serumskoj razini SHBG-a unutar obje istraživane skupine (PCOS: $F = 11{,}236$, $P < 0{,}001$, kontrola $F = 4{,}34$, $P = 0{,}001$). *Post hoc* analizom primjenjujući Tukeyev HSD-test pokazano je da je razlika u serumskim vrijednostima SHBG-a rezultat najviših vrijednosti SHBG-a u nosioca alela sa 6 TAAAA-ponavljanja u odnosu na one ispitanice koje nisu bile nosioci ovog alela.

Da bismo istražili kako ovaj genetički biljeg pretpostavlja razinu SHBG-a u serumu, provedena je multivarijantna analiza višestrukom regresijom sa SHBG-om kao zavisnom varijablom, što je prikazano u tablici 11. Kao nezavisne varijable uključili smo metaboličke (ITM, HOMA-IR), androgene (vrijednosti ukT-a) i genske ($TAAAA_{sv}$) parametre kao kontinuirane varijable. Ovaj model pokazuje značajan utjecaj *SHBG* $(TAAAA)_n$-genotipa na serumske razine SHBG-a u objema istraživanim skupinama ($P < 0{,}001$), dok je značajan utjecaj ostalih uključenih parametara izostao. Ovim modelom možemo objasniti 21,6 % (bolesnice s PCOS-om) i 14,9 % (kontrolna skupina) varijabilnosti serumske razine SHBG-a (prilagođene R^2-vrijednosti).

Tablica 11. Model višestruke linearne regresije sa SHBG-om kao ovisnom varijablom

	PCOS		Kontrola	
varijabla	standardizirani koeficijent β	*P*	standardizirani koeficijent β	*P*
$TAAAA_{SV}$	– 0,471	< 0,001	– 0,365	< 0,001
ITM	0,044	0,521	0,168	0,122
HOMA-IR	0,021	0,760	0,079	0,285
ukT	0,110	0,113	0,052	0,478
	$R^2 = 0{,}216$		*$R^2 = 0{,}149$*	

4.2.3. Polimorfizam jedne baze Asp327Asn gena *SHBG*

4.2.3.1. Povezanost Asp327Asn gena SHBG s PCOS-om

Učestalost Asp-alela u skupini bolesnica s PCOS-om bila je 93,8 % dok je učestalost Asn-alela bila 6,2 %, što se nije znatno razlikovalo u odnosu na kontrolnu skupinu kako je prikazano u tablici 12. ($P = 0{,}121$).

Raspodjela pojedinih genotipova između ispitivane i kontrolne skupine prikazana je u tablici 12. Bolesnice s PCOS-om bile su češći nosioci Asp/Asp-genotipa u odnosu na kontrolnu skupinu, ali razlika u učestalosti različitih genotipova nije bila statistički značajna

(P = 0,252). Asn/Asn-genotip našli smo samo u kontrolnoj skupini u dvije ispitanice. Zato smo za potrebe daljnje analize genotipove podjelili u dvije skupine: Asp/Asp i Asp/Asn + Asn/Asn.

Tablica 12. Učestalost Asp327Asn-alela i genotipova

	Alel (%)			Genotip (%)			
	Asp	Asn	P^1	Asp/Asp	Asp/Asn	Asn/Asn	P^1
PCOS (N = 214)	93,8	6,2	0,121	87,6	12,4	0	0,252
Kontrola (N = 209)	91,1	8,9		82,7	16,2	0,6	

[1] χ^2 test

Logističkom regresijom koja je uključivala PCOS-status (šifriran kao PCOS = 0, kontrola = 1) kao ovisnu varijablu i Asp327Asn-genotip (šifriran kao Asp/Asp = 1 i Asp/Asn + Asn/Asn = 2), ITM i dob kao kovarijante, pokazali smo da Asp327Asn-genotip nije značajan pretkazatelj nastanka PCOS-a (B = 0,390, P = 0,215).

4.2.3.2. Povezanost Asp327Asn gena *SHBG sa serumskim vrijednostima SHBG-a i androgena*

Nismo našli značajnu povezanost ovoga polimorfizma s različitim biokemijskim i kliničkim značajkama niti u jednoj istraživanoj skupini. Serumske vrijednosti SHBG-a bile su niže u nosioca Asn-alela u odnosu na one koje nisu nosioci neovisno o PCOS-statusu, ali razlika nije dosegla statističku značajnost (tablica 13).

Tablica 13. Kliničke i biokemijske značajke skupine s PCOS-om i kontrolne skupine, ovisno o Asp327Asn genotipu

		Genotip				
		Asp/Asp	N	Asp/Asn+ Asn/Asn	N	P^1
PCOS	ITM (kg/m^2)	22,2 (20,9 – 24,5)	134	23,0 (21,1 – 25,2)	19	0,738
	WHR	0,80 (0,74 – 0,85)	134	0,74 (0,73 – 0,85)	19	0,345
	ukT (nmol/L)	2,2 (1,7 – 2,9)	134	2,0 (1,5 – 2,9)	19	0,571
	slT (pmol/L)	38,5 (27,1 – 54,4)	134	40,4 (26,9 – 57,9)	19	0,896
	SHBG (nmol/L)	34,5 (20,0 – 55,0)	134	29,0 (23,0 – 35,0)	19	0,351
	HOMA-IR	1,6 (1,1 – 1,3)	134	1,8 (1,2 – 2,6)	19	0,565
Kontrola	ITM (kg/m^2)	21,6 (20,6 – 23,1)	148	22,2 (20,9 – 23,8)	31	0,137
	WHR	0,78 (0,74 – 0,84)	148	0,83 (0,75 – 0,85)	31	0,227
	ukT (nmol/L)	1,2 (0,9 – 1,5)	148	1,2 (1,0 – 1,5)	31	0,819
	slT (pmol/L)	13,4 (9,7 – 18,1)	148	16,1 (10,6 – 18,5)	31	0,464
	SHBG (nmol/L)	61,1 (34,3 – 78,0)	148	57,0 (11,0 – 79,1)	31	0,570
	HOMA-IR	1,3 (1,0 – 1,6)	148	1,3 (0,9 – 1,7)	31	0,536

[1]Mann-Whitneyjev U-test

Nije bilo značajnih razlika u serumskim vrijednostima ukT-a i slT-a kao niti u vrijednostima HOMA-IR između nosioca različitih genotipova u objema ispitivanim skupinama, što je prikazano u tablici 13.

4.2.3.3. Povezanost polimorfizama Asp327Asn i $(TAAAA)_n$ gena SHBG

U objema našim istraživanim skupinama prisutna je neravnoteža vezanosti gena između prisutnosti Asn-alela polimorfizma Asp327Asn i TAAAA-alela s 8 ponavljanja gena *SHBG*. U našoj ispitivanoj skupini 94,7 % bolesnica s PCOS-om, nosioca Asn-alela ujedno je i nosilac TAAAA-alela s 8 ponavljanja. Isto je zabilježeno i u 96,7 % ispitanica iz kontrolne skupine.

4.2.4. Minisatelitni polimorfizam VNTR-a u promotoru gena *INS*

4.2.4.1. Povezanost INS VNTR alela s PCOS-om

Učestalost *INS* VNTR-alela III. kategorije u skupini bolesnica s PCOS-om bila je 74,5 %, a kategorije I 25,5 %. Nije bilo značajne razlike u raspodjeli alela između ispitivanih skupina (P = 0,325) kao što je prikazano u tablici 14. U našoj istraživanoj populaciji nismo našli alele II. kategorije.

Tablica 14. Učestalost *INS* VNTR-alela i genotipova

	Alel (%)			Genotip (%)			
	III	I	P^1	III/III	I/III	I/I	P^1
PCOS (N = 214)	74,5	25,5	0,325	55,1	38,8	6,1	0,561
Kontrola (N = 209)	71,3	28,7		50,2	42,1	7,7	

[1] χ^2 test

Bolesnice s PCOS-om češće su bile homozigoti za III. kategoriju *INS* VNTR-alela u odnosu na kontrolnu skupinu, ali razlika nije dosegla statističku značajnost (tablica 14).

Logističkom regresijom koja je uključivala PCOS-status (šifriran kao PCOS = 0, kontrola = 1) kao ovisnu varijablu i *INS* VNTR-genotip (šifriranu kao III/III = 1 i I/III + I/I = 2), ITM i dob kao kovarijante pokazali smo da prisutnost alela klase III nije značajno povezana s PCOS-statusom (B = 0,248, P = 0,521).

4.2.4.2. Povezanost INS VNTR alela s vrijednostima inzulina u PCOS-skupini

Nismo našli značajnu razliku u ITM-u između različitih genotipova u skupini bolesnica s PCOS-om iako su nosioci genotipa I/I imali veću učestalost ITM-a > 25 kg/m^2 što je prikazano u tablici 15.

Tablica 15. Kliničke i biokemijske značajke skupine s PCOS-om i kontrolne skupine ovisno o *INS* VNTR-genotipu

		Genotip						
		III/III	N	I/III	N	I/I	N	P^1
PCOS	ITM (kg/m^2)	22,2 (20,9 – 24,1)	118	22,1 (20,7 – 24,7)	83	23,6 (21,5 – 24,8)	13	0,712
	ITM > 25 (kg/m^2)	18,6 %	22	22,9 %	19	23,1 %	3	0,744
	inzulin (mIU/L)	8,9 (7,4 – 10,9)	118	8,7 (6,2 – 11,8)	83	8,2 (6,7 – 9,7)	13	0,916
	HOMA--IR	1,7 (1,3 – 2,5)	118	1,6 (1,1 – 2,3)	83	1,5 (1,2 – 1,9)	13	0,894
Kontrola	ITM (kg/m^2)	21,8 (20,7 – 22,8)	105	21,5 (20,6 – 22,7)	88	21,2 (20,8 – 22,3)	16	0,539
	ITM > 25 (kg/m^2)	6,7	7	12,5	11	6,3	1	0,343
	inzulin (mIU/L)	7,6 (6,1 – 8,9)	105	6,6 (5,2 – 7,9)	88	6,8 (5,7 – 8,4)	16	0,104
	HOMA--IR	1,4 (1,1 – 1,7)	105	1,2 (1,0 – 1,5)	88	1,4 (1,2 – 1,5)	16	0,125

[1]Kruskal-Wallisov test kontinuirane varijable, χ^2 -test kategorijske varijable

Vrijednosti inzulina bile su najviše u nosilaca III/III homozigotnoga genotipa, kao i HOMA-IR, ali razlika nije bila statistički značajna (tablica 15).

4.2.5. Polimorfizam jedne baze C/T u egzonu 17 gena *INSR*

4.2.5.1. Povezanost C/T INSR-a s PCOS-om

Raspodjela učestalosti T-alela, kao i C-alela bila je podjednaka u objema istraživanim skupinama, kao što je prikazano u tablici 16 (P = 0,810). Raspodjela genotipova između ispitivane i kontrolne skupine, također nije bila značajno različita, iako je C/C-genotip češće prisutan u kontrolnoj skupini.

Tablica 16. Učestalost C/T *INS*- alela i genotipova

	Alel (%)			Genotip (%)			
	C	T	P^1	C/C	C/T	T/T	P^1
PCOS (N = 151)	80,3	19,7	0,810	63,2	34,2	2,6	0,631
Kontrola (N =179)	81,0	19,0		65,9	30,2	3,9	

[1] χ^2-test

Zbog niske učestalosti T/T-genotipa, za potrebe daljnje analize genotipove smo podijelili u dvije skupine: C/C i C/T + T/T.

Logističkom regresijom koja je uključivala PCOS-status (šifriran kao PCOS = 0, kontrola = 1) kao ovisnu varijablu i C/T-genotip (šifriran kao C/C = 1 i C/T + T/T = 2), ITM i dob kao kovarijante pokazali smo da prisutnost alela T nema poveznicu s PCOS-statusom ($B < 0{,}001$, $P = 1{,}000$).

4.2.5.2. Povezanost C/T INSR-a s vrijednostima inzulina i inzulinskom rezistencijom u bolesnica s PCOS-om

Nisu nađene značajne razlike u ispitivanim kliničkim i biokemijskim značajkama između skupine s PCOS-om i kontrolne skupine ispitanica ovisno o C/T *INSR*-genotipu što je prikazano u tablici 17.

Tablica 17. Kliničke i biokemijske značajke skupine s PCOS-om i kontrolne skupine ovisno o C/T *INSR*-genotipu

		Genotip				
		C/C	N	C/T+ T/T	N	P^1
PCOS	ITM (kg/m^2)	22,4 (21,0 – 25,2)	96	21,9 (20,9 – 24,5)	56	0,614
	ITM > 25 (kg/m^2) (%)	26,0	25	17,9	10	0,319
	inzulin (mIU/L)	8,6 (6,1 – 13,3)	96	8,8 (7,1 – 10,4)	56	0,966
	HOMA-IR	1,6 (1,0 – 2,5)	96	1,7 (1,2 – 2,2)	56	0,953
Kontrola	ITM (kg/m^2)	21,7 (20,7 – 23,1)	118	21,8 (20,6 – 23,2)	61	0,802
	ITM > 25 (kg/m^2) (%)	11,0	13	9,8	6	0,514
	inzulin (mIU/L)	6,9 (5,7 – 8,6)	118	6,8 (5,6 – 8,1)	61	0,691
	HOMA-IR	1,3 (1,0 – 1,7)	118	1,3 (1,0 – 1,5)	61	0,491

[1]Mann-Whitneyjev U-test kontinuirane varijable, χ^2-test kategorijske varijable

Bolesnice s PCOS-om, nosioci C/C genotipa češće su imale ITM > 25 kg/m^2 u odnosu na C/T + T/T-genotip, ali opisana razlika kao i razlika u osjetljivosti na inzulin nije bila značajna što je prikazano u tablici 17.

4.2.6. Polimorfizam jedne baze Gly972Arg gena *IRS-1*

4.2.6.1. Povezanost Gly972Arg gena IRS-1 s PCOS-om

Učestalost polimorfnog Arg-alela bila je veća u kontrolnoj, u odnosu na skupinu bolesnica s PCOS-om, ali ne značajno (P = 0,186). Raspodjela različitih alela i genotipova između ispitivanih skupina prikazana je u tablici 18.

Tablica 18. Učestalost Gly972Arg-alela i genotipova

	Alel (%)			Genotip (%)			
	Gly	Arg	*P*	Gly/Gly	Gly/Arg	Arg/Arg	*P*[1]
PCOS (N= 151)	93,7	6,3	0,186	87,5	11,8	0,7	0,506
Kontrola (N =179)	91,0	9,0		83,6	14,7	1,7	

[1] χ^2-test

Zbog niske učestalosti Arg/Arg-genotipa za potrebe daljnje analize genotipove smo podijelili u dvije skupine: Gly/Gly i Gly/Arg + Arg/Arg.

Logističkom regresijom koja je uključivala PCOS-status (šifriran kao PCOS = 0, kontrola = 1) kao ovisnu varijablu i Gly/Arg-genotip (šifriran kao Gly/Gly = 1 i Gly/Arg + Arg/Arg = 2), ITM i dob kao kovarijante, pokazali smo da prisutnost alela A nije značajno povezana s PCOS-statusom (B = 0,321, P = 0,337).

4.2.6.2. Povezanost Gly972Arg gena IRS-1 s vrijednostima inzulina i inzulinskom rezistencijom

Nisu nađene značajne razlike u ispitivanim kliničkim i biokemijskim značajkama između skupine s PCOS-om i kontrolne skupine ispitanica ovisno o Gly972Arg *IRS-1* genotipu što je prikazano u tablici 19.

Tablica 19. Kliničke i biokemijske značajke skupine s PCOS-om i kontrolne skupine ovisno o Gly972Arg *IRS-1* genotipu

		Genotip				
		Gly/Gly	N	Gly/Arg + Arg/Arg	N	P^1
PCOS	ITM (kg/m^2)	22,4 (21,0 – 24,8)	133	21,8 (20,7 – 24,8)	19	0,315
	ITM > 25 (kg/m^2) (%)	21,1	28	15,8	3	0,423
	inzulin (mIU/L)	8,7 (6,2 – 11,7)	133	9,0 (5,7 – 11,4)	19	0,800
	HOMA-IR	1,7 (1,1 – 2,3)	133	1,7 (1,2 – 2,3)	19	0,861
	HOMA-IR > 2,5 (%)	22,6	30	21,1	4	0,883
Kontrola	ITM (kg/m^2)	21,6 (20,6 – 23,1)	148	21,8 (21,0 – 22,7)	29	0,438
	ITM > 25 (kg/m^2) (%)	11,1	16	9,1	7	0,735
	inzulin (mIU/L)	7,1 (5,6 – 8,7)	148	6,4 (5,7 – 7,5)	29	0,150
	HOMA-IR	1,4 (1,0 – 1,7)	148	1,3 (1,1 – 1,4)	29	0,223

[1]Mann-Whitneyev U-test kontinuirane varijable, χ^2-test kategorijske varijable

Nosioci polimorfnog Arg-alela imali su nižu učestalost i niže vrijednosti ITM-a u odnosu na nosioce Gly/Gly genotipa, ali ne značajno. Nije bilo razlike u parametrima inzulinske rezistencije što je prikazano u tablici 19.

4.2.7. Polimorfizam jedne baze *Pro*12*Ala* gena *PPAR-γ*

4.2.7.1. Povezanost Pro12Ala gena PPAR-γ s PCOS-om

Nismo našli značajnu razliku u raspodjeli alela Pro i Ala između ispitivane i kontrolne skupine (P = 0,787), kao ni u raspodjeli pojedinih genotipova (P = 0,880) što je prikazano u tablici 20.

Tablica 20. Učestalost Pro12Ala alela i genotipova

	Alel (%)			Genotip (%)			
	Pro	Ala	P^1	Pro/Pro	Pro/Ala	Ala/Ala	P^1
PCOS (N= 151)	84,4	15,6	0,787	70,2	28,5	1,3	0,880
Kontrola (N =179)	85,2	14,8		72,1	26,3	1,7	

[1] χ^2-test

Zbog niske učestalosti Ala/Ala-genotipa za potrebe daljnje analize genotipove smo podijelili u dvije skupine: Pro/Pro i Pro/Ala + Ala/Ala.

Logističkom regresijom koja je uključivala PCOS-status (šifriran kao PCOS = 0, kontrola = 1) kao ovisnu varijablu i Pro/Ala genotip (šifriran kao Pro/Pro = 1 i Pro/Ala + Ala/Ala = 2), ITM i dob kao kovarijante, pokazali smo da prisutnost alela Ala nije značajno povezana s PCOS-statusom (B = 0,136, P = 0,594).

4.2.7.2. Povezanost Pro12Ala gena PPAR-γ s vrijednostima inzulina i inzulinskom rezistencijom u bolesnica s PCOS-om

Rezultati analize različitih kliničkih i biokemijskih značajki skupine s PCOS-om i kontrolne skupine ovisno o Pro12Ala prikazana je u tablici 21.

Tablica 21. Kliničke i biokemijske značajke skupine s PCOS-om i kontrolne skupine ovisno o Pro12Ala *PPAR-γ* genotipu

		Genotip				
		Pro/Pro	N	Pro/Ala+ Ala/Ala	N	P^1
PCOS	ITM (kg/m^2)	22,5 (21,1 – 25,1)	106	21,1 (20,5 – 23,9)	45	**0,037**
	ITM > 25 (kg/m^2) (%)	26,4	28	15,6	7	0,148
	inzulin (mIU/L)	9,2 (7,9 – 12,0)	106	6,1 (4,4 – 9,0)	45	**< 0,001**
	HOMA-IR	1,8 (1,4 – 2,4)	106	1,1 (0,9 – 1,7)	45	**< 0,001**
	SHBG (nmol/L)	30,5 (19,0 – 52,0)	106	39,0 (26,0 – 60,0)	45	0,105
	ukT (nmol/L)	2,3 (1,7 – 2,9)	106	2,0 (1,5 – 2,8)	45	0,588
Kontrola	ITM (kg/m^2)	21,6 (20,6 – 22,8)	129	22,0 (20,7 – 23,9)	50	0,375
	ITM > 25 (kg/m^2) (%)	11,6	15	8,0	4	0,480
	inzulin (mIU/L)	6,9 (5,9 – 8,6)	129	6,8 (4,3 – 8,0)	50	0,162
	HOMA-IR	1,4 (1,1 – 1,7)	129	1,2 (0,9 – 1,5)	50	0,067
	SHBG (nmol/L)	60,0 (35,1 – 78,0)	129	62,3 (31,2 – 82,0)	50	0,624
	ukT (nmol/L)	1,1 (0,9 – 1,5)	129	1,3 (1,0 – 1,6)	50	0,172

[1]Mann-Whitneyjev U-test kontinuirane varijable, χ^2-test kategorijske varijable

Bolesnice s PCOS-om koje su nosioci polimorfnog alela Ala imale su statistički značajno niže vrijednosti inzulina na tašte i HOMA-IR u odnosu na one koje nisu bile nosioci alela Ala (tablica 21.). U ovoj skupini zabilježene su i značajno niže vrijednosti ITM-a (P = 0,037). U kontrolnoj skupini ispitanica nije nađena razlika u vrijednostima inzulina i HOMA-IR ovisno o Pro12Ala-genotipu.

Kako bismo analizirali utjecaj Pro12Ala-polimorfizma na inzulinsku osjetljivost u bolesnica s PCOS-om konstruirali smo model linearne regresije gdje je HOMA-IR uključen kao ovisna varijabla, a Pro/Ala-genotip (šifriran kao Pro/Pro = 1 i Pro/Ala + Ala/Ala = 2), ITM i ukT kao neovisne varijable. Ovaj model može objasniti 8,4 % (R^2) varijabilnosti u vrijednostima HOMA-IR. Prisutnost polimorfnog alela Ala, ali i ITM, zajedno su se pokazali kao značajni pretkazatelji ove varijabilnosti (P = 0,030, P = 0,041) kao što je prikazano u tablici 22.

Tablica 22. Model višestruke linearne regresije s HOMA-IR kao ovisnom varijablom

Varijabla	Standardizirani β-koeficijent	*P*-vrijednost
Neprilagođeni model ($R^2 = 0,037$)		
PPAR-γ genotip	– 0,192	**0,018**
Prilagođeni model ($R^2 = 0,084$)		
PPAR-γ genotip	– 0,174	**0,030**
ITM	0,164	**0,041**
ukT	0,144	0,071

5. RASPRAVA

Sindrom policističnih jajnika složeni je genski poremećaj. U ovom smo istraživanju pokušali povezati prisutnost polimorfizama odabranih gena s kliničkim i biokemijskim odrednicama sindroma policističnih jajnika. Prema našim spoznajama ovo je prva asocijacijska studija koja je istraživala gene kandidate u podlozi sindroma policističnih jajnika u Hrvatskoj populaciji. Posljednjih godina istraživana je povezanost više od 100 gena s nastankom PCOS-a, a koji su najčešće bili uključeni u metabolizam i djelovanje androgena ili metabolizam i djelovanje inzulina (28). Osnovno ograničenje ovih studija bio je mali broj uključenih bolesnica (manji od 50) te neujednačenost dijagnostičkih kriterija. Zato smo u ovom istraživanju odlučili dokazati ili opovrgnuti povezanost polimorfizama šest gena kandidata s PCOS-om jer rezultati dosadašnjih istraživanja u različitim populacijama nisu bili dosljedni. Prednost našeg istraživanja je veliki broj etnički ujednačenih ispitanica u kojih je korišten jedinstveni kriterij u dijagnozi.

5.1. Kliničke i biokemijske značajke istraživane populacije

Klinička ocjena hiperandrogenizma podložna je brojnim kritikama. Procjena hirzutizma je relativno subjektivna, ne koriste se svi istraživači standardiziranom FG-ljestvicom, a i velik broj bolesnica kozmetički tretira dlake, što otežava procjenu (6, 7). U ovoj studiji samo je jedan ispitivač ocjenjivao stupanj hirzutizma i akni, čime smo zaobišli moguću istraživačku pristranost. U našoj skupini bolesnica s PCOS-om 76,9 % ih je imalo hirzutizam, dok su akne nađene u 51,6 % bolesnica, što je više nego što su o tome izvijestili drugi istraživači (13). U meta-analizi Azzizija i sur., izračunana je kumulativna učestalost hirzutizma od oko 60 %, a akni oko 15 – 25 % u bolesnica s PCOS-om, svih rasnih skupina zajedno (13). Opisanu veću učestalost hirzutizma i akni u našoj populaciji bolesnica s PCOS-om tumačimo izraženijim hiperandrogenim stigmama u pripadnica mediteranske rase kojoj pripadaju Hrvatice (111).

Vrijednosti androgena u serumu bile su znatno više u bolesnica s PCOS-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Prema podatcima iz literature procjenjuje se da 60 – 80 % bolesnica s PCOS-om ima povišene cirkulirajuće androgene (18). U našoj skupini bolesnica s PCOS-om povišene vrijednosti ukT-a > 3 nmol/L zabilježili smo u 29,4 % bolesnica. Ova vrijednost ukT-a gornja je referenta granica ako se koristimo preporukama proizvođača (Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson, Rochester, New York, SAD). Danas se sve više naglašava

problem osjetljivosti i točnosti određivanja ukT-a u žena (23). Serumske koncentracije ukT-a deset su puta niže, dok su koncentracije slT-a čak dvadeset puta niže u ženskoj u odnosu na mušku populaciju (22, 23). Stoga smatramo da je nužno postaviti nove granice vrijednosti testosterona u ženskoj populaciji. Za našu istraživanu populaciju povišene vrijednosti testosterona definirali smo u odnosu na 95. percentilu za vrijednosti testosterona u kontrolnoj skupini ispitanica (2,0 nmol/L za ukT odnosno 26 nmol/L za slT). Šezdeset i dva posto bolesnica s PCOS-om imalo je povišene vrijednosti ukT-a iznad 2,0 nmol/L dok je čak 70,6 % imalo povišene vrijednosti slT-a. Naši su nalazi u skladu s nalazima dosadašnjih istraživanja koja su pokazala povišene vrijednosti androgena u oko 60 – 80 % bolesnica s PCOS-om (13).

Klinički izraženi poremećaji ciklusa bili su prisutni u čak 90 % bolesnica s PCOS-om u našoj istraživanoj skupini u odnosu na dosad izvještavanih 75% u studijama čiji su rezultati sažeti u velikoj meta-analizi AES-a (13). Jedan od mogućih razloga veće učestalosti poremećaja ciklusa jest činjenica da su naše bolesnice s PCOS-om regrutirane u ginekološkoj klinici. Vodeći razlog njihova dolaska bili su poremećaji ciklusa što je vjerojatno utjecalo na rezultate.

Ultrazvučni nalaz policističnih jajnika bio je prisutan u gotovo svih bolesnica s PCOS-om u našoj istraživanoj skupini. Samo je sedam bolesnica s PCOS-om (3,3 %) imalo uredan UZV-nalaz, što je mnogo niže u odnosu na 25 % bolesnica s PCOS-om u već spomenutoj meta-analizi AES-a (13). Smatramo da postoji veliki ograničujući čimbenik u podlozi studija uključenih u ovu meta-analizu koji su moguće utjecali na ovako veliku razliku prema našim rezultatima. U većini studija iz SAD-a UZV nisu radili liječnici već ultrazvučni tehničari koji nemaju klinički uvid u dijagnozu poput liječnika kliničara (13). Prednost našeg istraživanja jest u činjenici da su svi ultrazvučni pregledi provedeni u jednoj ustanovi, na istom uređaju, transvaginalnim ultrazvukom i od strane jednog liječnika koji se strogo držao Rotterdamskih kriterija za dijagnozu.

Većina ispitanica uključenih u ovo istraživanje bila je normalne tjelesne mase u objema istraživanim skupinama (79,4 % skupina s PCOS-om *vs* 90,9 % kontrolna skupina). Vrijednosti inzulina u serumu bile su unutar normalnih granica u objema skupinama ispitanica, ali statistički značajno više u skupini bolesnica s PCOS-om. Kad smo skupinu bolesnica s PCOS-om raščlanili prema ITM-u našli smo da 12,4 % bolesnica s PCOS-om i ITM-om < 25 kg/m^2 ima inzulinsku rezistenciju u odnosu na 40,9 % bolesnica s PCOS-om i ITM-om ≥ 25 kg/m^2. Veća učestalost inzulinske rezistencije u skupini žena s višim ITM-om

je očekivana, s obzirom na to da se smatra kako je povišena tjelesna masa okidač snažnijeg očitovanja inzulinske rezistencije u bolesnica s PCOS-om (15). Prema podatcima iz literature oko 80 % bolesnica s PCOS-om povećane tjelesne mase i 35 % bolesnica s PCOS-om, normalne tjelesne mase ima inzulinsku rezistenciju (3, 41). U našoj istraživanoj populaciji bolesnica s PCOS-om ukupno je 18,2 % bolesnica imalo inzulinsku rezistenciju, što je u skladu s nalazima Gambinerija i sur., koji su istraživali prisutnost inzulinske rezistencije u mediteranskoj populaciji bolesnica s PCOS-om (112). Prisutnost inzulinske rezistencije u 12,4 % bolesnica s PCOS-om i ITM-om < 25 kg/m^2, potvrđuje činjenicu da se njezin nastanak ne može tumačiti samo debljinom (27). Serumske vrijednosti SHBG-a u bolesnica s PCOS-om značajno su niže od vrijednosti izmjerenih u kontrolnoj skupini ispitanica. Očekivali smo da će vrijednosti ITM-a značajno negativno korelirati s vrijednostima SHBG-a (15, 113). Negativna korelacija postoji, ali je slaba i nije značajna. To je vjerojatno posljedica činjenice da su naše ispitanice u najvećem broju slučajeva bile normalne tjelesne mase.

Analizirajući kliničke i biokemijske značajke naše istraživane populacije bolesnica s PCOS-om, možemo zaključiti da su naše bolesnice u najvećem broju slučajeva imale izražene sve tri dijagnostičke značajke PCOS-a (hiperandrogenizam, poremećaje ciklusa i PCO-nalaz na ultrazvuku). Glavnina bolesnica s PCOS-om imala je normalnu tjelesnu masu. Učestalost inzulinske rezistencije u ovoj skupini bolesnica s PCOS-om manja je u odnosu na dosad opisanu učestalost u drugim populacijama bolesnica s PCOS-om normalne tjelesne mase (3, 27, 41, 112).

5.2. Povezanost istraživanih polimorfizama s PCOS-om

5.2.1. Mikrosatelitni polimorfizam $(CAG)_n$ gena *AR*

Veća učestalost kraćih CAG-ponavljanja nađena je u objema istraživanim skupinama. S obzirom na podjednaku raspodjelu alela CAG neovisno o PCOS-statusu zaključujemo da gen *AR* nije ključan za nastanak PCOS-a. Podjednaka raspodjela CAG-ponavljanja između bolesnica s PCOS-om i kontrolnih skupina u skladu je s nalazima prethodno objavljenih studija (65–67, 114, 115).

S obzirom na to da postoji značajna varijabilnost u broju CAG-ponavljanja, dosadašnje studije koristile su se različitim metodama u definiciji broja CAG-ponavljanja kao istraživane varijable. U analizi rezultata većina se koristila srednjom vrijednošću zbroja obaju alela, gdje su potom kratki i dugi genotipovi definirani u odnosu na medijan čitave istraživane

populacije. Gen *AR* je pod utjecajem fenomena X-inaktivacije metilacijom HpaII i HhaI mjesta (116). X-inaktivacija nije ni savršeno slučajna (50 : 50) niti savršeno neslučajna (100 : 0), što može imati za posljedicu razlike u aktivnosti proteina AR (117). Preferirana ekspresija alela CAG s kraćim brojem ponavljanja pridonijela bi povišenoj osjetljivosti na androgene. Zato smo ispitanice s heterozigotnom kombinacijom genotipova s jednim kraćim, a drugim alelom duljim od medijana isključili iz analize.

U ovom istraživanju ispitali smo utjecaj broja CAG-ponavljanja na različite kliničke i biokemijske značajke bolesnica s PCOS-om. Analizom razlika između biokemijskih i kliničkih parametara među bolesnicama s PCOS-om, s kratkim i dugim alelima našli smo značajne razlike u razini ukT-a u serumu (P = 0,019). Pearsonovom analizom korelacije pokazali smo linearnu povezanost između duljine CAG-ponavljanja i serumske razine ukT-a (R = 0,225, P = 0,015). Pozitivna korelacija postoji i nakon prilagodbe za dob, ITM-a i HOMA-IR-a. Istom analizom u kontrolnoj skupini nismo našli značajne razlike za navedene biokemijske parametre. Poznato je da ITM utječe na razinu cirkulirajućih androgena snizujući razinu SHBG-a dok inzulin izravno stimulira sintezu androgena u teka-stanicama jajnika (15). Postoji trend smanjivanja razine androgena ovisno o dobi, što je potvrđeno u istraživanju Spencera i sur., u 260 zdravih eumenoroičnih žena (118). Zbog navedenoga smatra se da se ITM, osjetljivost na inzulin te dob, moraju uzeti u obzir kad se analizira hiperandrogenemija u žena.

Prema hipotezama i analizama istraživanja *in vitro*, nosioci kraćega broja CAG-ponavljanja imaju veću transkripcijsku aktivnost AR-receptora (54). Zato su se očekivale više razine testosterona u nosioca ovih alela. Suprotno tomu, samo je nekoliko istraživanja potvrdilo povezanost između broja CAG-ponavljanja i serumske razine testosterona u bolesnica s PCOS-om i to s oprječnim rezultatima (64, 66, 67, 119). U skupini postmenarhalnih djevojčica s preuranjenom pubarhom, Ibanez i sur. našli su kraće alele (< 20 CAG-ponavljanja), više vrijednosti androgena u serumu te izraženije znakove hiperandrogenizma (119). Westberg i sur. pokazali su u 270 premenopauzalnih žena iz Švedske, da nosioci kraćega broja CAG-ponavljanja imaju više razine androgena u serumu od onih s duljim brojem ponavljanja (120). Naši nalazi o linearnom odnosu između broja CAG-ponavljanja i razine testosterona u skladu su s nalazima Hickeyja i sur. te Kima i sur. u bolesnica s PCOS-om iz Australije, odnosno Koreje (64, 66). Hickey i sur., pokazali su da postoji preferirana ekspresija duljih CAG-alela u bolesnica s PCOS-om (duljih od 22 ponavljanja), koji su u pozitivnoj korelaciji s razinom testosterona u serumu (64). Autori ove

studije smatraju da postoji mogućnost da u ranom prenatalnom razvoju niska androgena aktivnost u nosioca duljih alela služi kao okidač mehanizma povratne sprege koja rezultira povišenim lučenjem androgena (64). Misfud i sur. pokazali su da kineske bolesnice s PCOS-om imaju veću učestalost CAG-alela s manjim brojem ponavljanja, ali ovaj odnos nije bio linearan (67).

S obzirom na to da se broj CAG-ponavljanja pokazao kao pretkazatelj varijabilnosti ukT-a samo u skupini bolesnica s PCOS-om, vjerujemo da barem malo pridonosi još uvijek ne u potpunosti poznatoj etiologiji PCOS-a. Iako smo našli značajnu pozitivnu korelaciju između broja CAG-ponavljanja i razine ukT-a, to je još uvijek umjerena korelacija (R = 0,225, P = 0,015). Modelom linearne regresije uspjeli smo objasniti svega 8,5 % varijabilnosti serumske razine ukT-a. Zaključujemo da postoje drugi čimbenici koji utječu na aktivnost AR-a. Nedavni napredci molekularne biologije upozorili su na postojanje različitih koregulatora (koaktivatora i korepresora) za AR, koji utječu na aktivnost androgena putem komunikacije s AR-om (121). Time se otkrivaju novi mogući mehanizmi kojima se može modulirati transkripcijska aktivnost receptora.

Iako smo pretpostavili da će zbog veće aktivnosti AR-receptora, ispitanice s kraćim alelima imati izraženije kliničke znakove hiperandrogenizma – hirzutizam i akne, to nismo potvrdili u ovoj studiji. Isto tako, više razine ukT-a u nosilaca alela s duljim brojem ponavljanja nisu imale utjecaj na akne i hirzutizam. Ovi su nalazi u skladu s nalazima prijašnjih studija koje nisu našle razliku u broju CAG-ponavljanja između bolesnica s hirzutizmom i bez hirzutizma (63, 69, 122). Vottero i sur. zabilježili su kraće alele samo u skupini hirzutističnih bolesnica, ali to nisu potvrdili drugi istraživači (69, 122).

Iz svega navedenoga možemo zaključiti da polimorfizam CAG-a u genu *AR* nije glavna odrednica PCOS-statusa, ali je pretkazatelj serumskih vrijednosti ukT-a u hrvatskih bolesnica s PCOS-om. Ipak, model linearne regresije objašnjava samo 8,5 % varijabilnosti u serumskim vrijednostima ukT-a. Smatramo da je glavni ograničujući čimbenik našega istraživanja bio da smo broj CAG-ponavljanja analizirali izolirano kao jedini čimbenik koji utječe na transkripcijsku aktivnost *AR*-a. Buduće studije moraju biti usmjerene na istraživanje više različitih signalnih puteva koji utječu na aktivnost androgena, posebno na ulogu brojnih novootkrivenih koregulatora AR-a.

5.2.2. Mikrosatelitni polimorfizam $(TAAAA)_n$ i polimorfizam jedne baze Asp327Asn gena *SHBG*-a

Raspon i raspodjela broja TAAAA-ponavljanja u objema istraživanim skupinama podudarni su s raspodjelom opisanom u drugim populacijama (73–75, 79, 123). Nismo našli značajnu razliku u raspodjeli TAAAA-genotipova između bolesnica s PCOS-om i kontrolnih skupina. Xita i sur. pokazali su da su bolesnice s PCOS-om češći nosioci alela TAAAA s većim brojem ponavljanja (> 8) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanica (123). Ovaj trend zabilježen je i u našoj skupini bolesnica s PCOS-om, ali razlika u odnosu na kontrolnu skupinu nije bila statistički značajna. Prisutnost genotipa s dugim alelima nije se pokazala kao značajan pretkazatelj nastanka PCOS-a u našoj ispitivanoj populaciji.

Niske razine SHBG-a u serumu karakterističan su nalaz u bolesnica s PCOS-om (9, 15). U našoj studiji serumske razine SHBG-a bile su znatno niže u skupini bolesnica s PCOS-om, neovisno o genotipu pojedine bolesnice. Ovaj nalaz podudaran je s nalazima prethodno provedenih studija koje su istraživale povezanost TAAAA-polimorfizma sa serumskim vrijednostima SHBG-a (73–75, 123). U objema istraživanim skupinama postoji značajna negativna korelacija između serumskih razina SHBG-a i $TAAAA_{sv}$, koja je izraženija u skupini bolesnica s PCOS-om ($R = – 0{,}467$, $P < 0{,}001$).

Analizom varijance pokazali smo da su značajne razlike u serumskim vrijednostima SHBG-a rezultat znatno viših serumskih vrijednosti u nosilaca alela TAAAA sa 6 ponavljanja. Slične rezultate pokazali su Cousin i sur. u studiji koja je uključivala 303 bolesnice s hirzutizmom u kojih su najviše vrijednosti SHBG-a u serumu imale bolesnice homozigoti za 6/6 genotip (74). U studiji Xite i sur. najviše serumske razine SHBG-a zabilježene su u bolesnica s PCOS-om, koje su bile nosioci alela s manje od osam ponavljanja (123). Aleli sa šest TAAAA-ponavljanja pokazali su se povezanima s višim vrijednostima SHBG-a u serumu zdravih muškaraca (76–78).

Modelom linearne regresije objasnili smo 21,6 %, odnosno 14,9 % varijacija u serumskim razinama SHBG-a u bolesnica s PCOS-om, odnosno u kontrolnim skupinama. S obzirom na to da TAAAA-genotip znatno utječe na vrijednosti SHBG-a u skupini bolesnica s PCOS-om, smatramo ga primljivim polimorfizmom za razvoj hiperandrogenizma u bolesnica s PCOS-om. Pretpostavlja se da genski determinirane niske razine SHBG-a u nosilaca

polimorfizma s većim brojem TAAAA-ponavljanja, uvjetuju izloženost višim vrijednostima slobodnih androgena te utječu na izraženost PCOS-fenotipa (73).

Nismo našli značajne razlike u učestalosti alela Asp327Asn između istraživanih skupina, što je u skladu s nalazima dijela prethodno provedenih studija (74, 75, 124). U studiji Cousina i sur., u francuskoj populaciji hirzutističnih žena, pokazano je da nosioci alela Asn imaju znatno više vrijednosti serumskoga SHBG-a te da je Asn-polimorfizam značajan pretkazatelj serumskih vrijednosti SHBG-a (74). Više vrijednosti SHBG-a u nosilaca polimorfnoga alela Asn opisane su u studijama koje su uključivale žene u postmenopauzi (79, 125). Sukladno ovim nalazima očekivali smo više vrijednosti serumskoga SHBG-a u nosilaca polimorfnog alela, ali razlike u serumskim vrijednostima SHBG-a između istraživanih genotipova nisu nađene. Naši su rezultati podudarni s nalazima Bendlove i sur., u populaciji bolesnica s PCOS-om iz Češke (124) te s istraživanjima u muškoj populaciji (76, 77). U studiji Ferk i sur. opisane su čak niže vrijednosti SHBG-a u nosilaca polimorfnog alela (75). Izostanak očekivane povezanosti između Asp327Asn-polimorfizma i serumskih razina SHBG-a mogao bi biti posljedica etničkih razlika u fiziološkom učinku alela Asn (76).

Prisutnost polimorfnoga alela Asn nije utjecao na razinu slobodnih androgena u serumu naših bolesnica s PCOS-om. Ovaj je nalaz očekivan, s obzirom na to da koncentracija SHBG-a izravno utječe na razinu slobodnih androgena u serumu (22).

U dosadašnjim studijama nađena je neravnoteža povezanosti (LD) između alela TAAAA s osam ponavljanja i alela Asn u genu *SHBG* (74–76). S obzirom na to da je pokazano kako je prisutnost Asn-polimorfizma povezana s produljenim vijekom SHBG-a, postoji mogućnost da je utjecaj 8/8 genotipa na serumske razine SHBG-a maskiran ovim polimorfizmom. U našem istraživanju, također smo pokazali opisanu neravnotežu povezanosti alela u objema ispitivanim skupinama. Ipak, s obzirom na jednaku raspodjelu Asn-polimorfizma između istraživanih skupina, vrlo nisku učestalost alela Asn te izostanka povezanosti ovoga polimorfizma sa serumskim koncentracijama SHBG-a, smatramo da ovaj nalaz nije utjecao na naše rezultate.

U zaključku, naši rezultati nisu pokazali značajnu razliku u učestalosti $(TAAAA)_n$-alela i alela Asn gena *SHBG* između bolesnica s PCOS-om i kontrolne skupine. Pokazali smo jaku linearnu povezanost između $(TAAAA)_n$-genotipa i serumskih razina SHBG-a neovisno o PCOS-statusu, ali nismo našli značajne razlike u serumskim razinama SHBG-a ovisno o

Asp327Asn-genotipu. Utjecaj TAAAA *SHBG*-genotipa na serumske razine SHBG-a čini ga primljivim polimorfizmom za razvoj hiperandrogenemija, a ne samoga PCOS-a u našoj populaciji.

5.2.3. Minisatelitni polimorfizam $(VNTR)_n$ gena *INS* te polimorfizmi jedne baze C/T gena *INSR* te Gly972Arg gena *IRS-1*

Spoznaja da je inzulinska rezistencija čest pratilac PCOS-a neovisno o stupnju debljine, potaknula je istraživanja usmjerena na traženje uzroka u različitoj ekspresiji gena za inzulin, gena za njegov receptor kao i promijenjenu ekspresiju prvog supstrata u inzulinskom signalnom putu IRS-1 (96).

U našem istraživanju nismo našli značajnu razliku u učestalosti III. kategorije VNTR-alela *INS* u odnosu na I. kategoriju, kao ni značajnu razliku u učestalosti pojedinih genotipova između bolesnica s PCOS-om i kontrolne skupine. Stoga zaključujemo da ovaj polimorfizam nije značajan genetički čimbenik za razvoj PCOS-a u našoj populaciji. To je u skladu s dijelom prethodno provedenih istraživanja u kojima nije nađena povezanost ovoga polimorfizma s policističnim jajnicima, odnosno hiperandrogenizmom u češkoj, španjolskoj, engleskoj, finskoj i kineskoj populaciji bolesnica s PCOS-om (126–129).

Naše bolesnice s PCOS-om bile su češći nosioci homozigotnoga genotipa VNTR-alela *INS*, kategorije III, u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ta razlika nije dosegla statističku značajnost. Nismo našli dokaza o utjecaju *INS* VNTR-polimorfizma na lučenje inzulina. Ovi su nalazi u skladu sa studijom Vankove i sur. u češkoj populaciji bolesnica s PCOS-om (128). Danas se smatra da su poremećaji koje nalazimo na inzulinskom metaboličkom putu zapravo rezultat istodobne međusobne interakcije više čimbenika (41). Ferk i sur. analizirali su povezanost ovoga polimorfizma u interakciji s povišenim ITM-om u slovenskoj populaciji bolesnica s PCOS-om i pokazali su da bi ovaj genotip u interakciji s ITM-om mogao biti predisponirajući čimbenik za PCOS (86). U našoj istraživanoj populaciji bolesnica s PCOS-om nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima inzulina između pojedinih genotipova. Glavni ograničujući čimbenik naših nalaza koji uključuju metaboličke parametre jest malen broj bolesnica s ITM-om > 25 kg/m^2, što je sigurno utjecalo na pristranost naših rezultata.

U zaključku, nismo potvrdili očekivanja da su aleli *INS* VNTR-a III. kategorije povezani s PCOS-om, kao ni da nosioci ovog alela imaju više vrijednosti inzulina na tašte, odnosno izraženiju inzulinsku rezistenciju u odnosu na one koji nisu nosioci III. kategorije

alela. Prethodne studije vjerojatno su precijenile povezanost *INS* VNTR-a III. kategorije s PCOS-om (84, 130). Ipak, s obzirom na to da su bolesnice s PCOS-om u našoj studiji imale niži ITM nego u navedenim studijama, ne možemo u potpunosti isključiti ulogu ovoga polimorfizma u nastanku inzulinske rezistencije u bolesnica s PCOS-om i povišenom tjelesnom masom.

Nismo našli značajnu razliku u raspodjeli alela C/T *INSR*-gena između skupine bolesnica s PCOS-om i kontrolne skupine ispitanica. Učestalost alela T, kao i homozigotnog T/T-genotipa bila je značajno niža nego što je to opisano u dosadašnjim studijama (96). Nije bilo značajne razlike u raspodjeli različitih genotipova između ispitivanih skupina u našoj istraživanoj populaciji. Stoga zaključujemo da ovaj polimorfizam nije značajno povezan s nastankom PCOS-a što su pokazale i prethodno učinjene studije u koreanskoj i turskoj populaciji bolesnica s PCOS-om (91, 131). Pozitivni rezultati o povezanosti C/T *INSR*-a i PCOS-a pokazani su uglavnom u skupinama bolesnica s PCOS-om normalne tjelesne mase (58, 89, 92). Učestalost alela T bila je znatno viša u bolesnica s PCOS-om iz SAD-a s ITM-om < 27 kg/m^2 u studiji Siegel i sur. (58). Chen i sur. pokazali su da je polimorfizam gena *INSR* jedan od čimbenika primljivosti za PCOS u populaciji mršavih bolesnica s PCOS-om iz Kine (89). Glavni nedostatak ovih dviju studija jest da nisu istraživale povezanost ovoga polimorfizma s vrijednostima inzulina i inzulinskom rezistencijom, s obzirom na to da se upravo genski poremećaj u inzulinskom putu smatra mogućim mehanizmom nastanka inzulinske rezistencije u bolesnica s PCOS-om normalne tjelesne mase (41). Mukherjee i sur., također su pokazali da je polimorfni genotip znatno povezan s PCOS-om u skupini mršavih bolesnica iz Indije (ITM < 23 kg/m^2) te da je znatno povezan s višim vrijednostima inzulina na tašte i HOMA-IR (92). ITM je u našoj skupini bolesnica s PCOS-om pokazivao tendenciju nižih vrijednosti u nosilaca polimorfizma u odnosu na C/C-genotip, ali razlika nije bila statistički značajna.

Nismo našli povezanost između C/T-polimorfizma s vrijednostima inzulina i/ili inzulinske rezistencije. Nedavno provedena meta-analiza Ionannidisa i sur., koja je analizirala osam studija koje su istraživale povezanost polimorfizma C/T *INSR*-a s PCOS-om, uključujući i ove već navedene, nije kumulativno našla dokaze o njihovoj povezanosti (96). Glavni nedostatak ove meta-analize jest da nije uzela u obzir mogući zajednički utjecaj međusobne interakcije C/T-polimorfizma s ITM-om na nastanak PCOS-a.

U zaključku, rezultati dijela prethodno provedenih studija pokazali su da je C/T-polimorfizam gena *INSR* utjecao na razvoj PCOS-a u bolesnica normalne, u odnosu na povišenu tjelesnu masu (58, 89, 92). Iako su bolesnice s PCOS-om u našoj istraživanoj populaciji bile uglavnom normalne tjelesne mase C/T-polimorfizam gena *INSR* nije se pokazao značajno povezanim s nastankom PCOS-a u našoj istraživanoj skupini. U budućnosti bi trebalo uključiti veći broj bolesnica s PCOS-om i s povećanom tjelesnom masom, koje bi se podijelilo prema ITM-u, odnosno prema osjetljivosti na inzulin kako bi se smanjilo moguću istraživačku pristranost u tumačenju rezultata.

Nismo našli značajne razlike u raspodjeli Gly972Arg-genotipova između ispitivanih skupina u našoj populaciji. Podjednaka distribucija ovoga genotipa opisana je i u čileanskoj, španjolskoj i tajvanskoj populaciji (98, 132, 133). Učestalost polimorfnog alela Arg kao i Arg/Arg-genotipa vrlo je rijetka u našoj istraživanoj populaciji te suprotno očekivanjima nešto češća u kontrolnoj skupini.

Značajna razlika u učestalosti Gly972Arg-polimorfizma *IRS-1* u do danas provedenim studijama nađena je između bolesnica s PCOS-om, koje su se razlikovale s obzirom na osjetljivost na inzulin (95, 98). Pokazalo se da su na inzulin rezistentne bolesnice s PCOS-om češći nosioci polimorfnog alela Arg pa se smatra da je alel Arg povezan s nastankom inzulinske rezistencije u bolesnica s PCOS-om (93, 95, 98, 134). U našoj istraživanoj populaciji bolesnica s PCOS-om nisu nađene značajne razlike u inzulinskoj osjetljivosti između pojedinih genotipova.

Nalazi opisanih studija uključeni su u meta-analizu koja je kumulativno potvrdila povezanost Gly872Arg-polimorfizma s rizikom nastanka PCOS-a u 11 analiziranih studija (96). Pokazano je da je Arg/Arg-genotip izuzetno rijedak (kumulativno 4,3 % kontrolna skupina *vs* 6,7 % skupina s PCOS-om), što je zabilježeno u našoj istraživanoj populaciji. Autori meta-analize smatraju da je nalaz povišena rizika za PCOS isključivo posljedica povišenih vrijednosti inzulina na tašte, što nalazimo u nosilaca alela Arg (96). U našoj studiji nismo našli razliku u vrijednostima inzulina među nosiocima različitih Gly872Arg-genotipova neovisno o PCOS-statusu. Vjerujemo da je to rezultat vrlo niske učestalosti polimorfnog alela, ali i niske učestalosti inzulinske rezistencije u našoj istraživanoj populaciji.

U zaključku, nalazi većine dosadašnjih studija pokazuju da je Gly972Arg-polimorfizam učestaliji u bolesnica s PCOS-om i s inzulinskom rezistencijom. Ovaj se

polimorfizam ne čini značajan u razvoju PCOS-a u našoj istraživanoj populaciji, ali njegov utjecaj na homeostazu glukoze i ITM ne možemo isključiti zbog maloga broja na inzulin rezistentnih bolesnica s PCOS-om u našoj istraživanoj populaciji.

5.2.4. Polimorfizam jedne baze Pro12Ala gena *PPAR-γ*

Polimorfni alel Ala12 prisutan je u oko 30 % naše istraživane populacije, što je u skladu s učestalošću opisanom u bijeloj rasi (135). Nismo našli znatnu razliku u raspodjeli alela Pro12Ala ili genotipova između istraživanih skupina. Ovi nalazi podudarni su s nalazima dijela prethodno provedenih studija u talijanskoj, turskoj, grčkoj, njemačkoj, kineskoj i američkoj populaciji bolesnica s PCOS-om (103, 104, 136-140). U navedenim studijama nije nađena znatna povezanost ovoga polimorfizma s PCOS-om. Međutim, kad su njihovi rezultati kumulativno obrađeni u meta-analizi San-Millana i sur., pokazalo se da nosioci polimorfnog alela Ala12 imaju manji rizik za nastanak PCOS-a (141). Ovaj nalaz rezultat je nižih vrijednosti inzulina i HOMA-IR u nosilaca alela Ala12 (141).

Nosioci polimorfnog alela Ala12 naše skupine bolesnica s PCOS-om imali su znatno niže vrijednosti inzulina kao i vrijednosti HOMA-IR. Ovakav utjecaj Ala12-polimorfizma na parametre inzulinske rezistencije opisan je u nekoliko prethodno provedenih studija, ali samo u skupini bolesnica s PCOS-om i povišenom tjelesnom masom (60, 103, 137). Modelom linearne regresije u koji smo uključili Pro/Ala-genotip, ITM i ukT kao neovisne varijable, objasnili smo 8,4 % varijabilnosti u inzulinskoj osjetljivosti (izraženoj kao HOMA-IR). Prisutnost polimorfnog alela Ala, kao i ITM, pokazali su se kao značajni pretkazatelji vrijednosti HOMA-IR. Opisana povezanost Pro12Ala-polimorfizma s parametrima inzulinske rezistencije nije nađena u kontrolnoj skupini.

Povezanost ITM-a sa Pro12Ala-polimorfizmom vrlo je složena jer postoji dokazana interakcija između *PPAR-γ* genotipa i okoliša, koja utječe na rezultate. Slobodne masne kiseline koje nastaju u procesima prehrane i metabolizma prirodni su ligandi za *PPAR-γ* (142, 143). Interakcija polimorfnog alela Ala s ITM-om te osjetljivosti na inzulin ovisi o omjeru polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina unesenih prehranom, što je opisano u studiji Luana i sur. (144). Nosioci polimorfnog alela Ala osjetljiviji su na pozitivan učinak aerobnoga treninga na metabolizam, što pokazuje da fizička aktivnost može modulirati aktivnost *PPAR-γ* (143, 145). Zabilježili smo znatno niže vrijednosti ITM-a u skupini bolesnica s PCOS-om i s polimorfnim alelom Ala12. U ovoj studiji nisu analizirane prehrambene navike ispitanica iako pretpostavljamo da je velik udio onih koje prakticiraju mediteransku prehranu. U studiji

Ranilovića i sur. potvrđeno je da su prehrambene navike Hrvata najsličnije talijanskoj populaciji (146). Mediteranska prehrana bogata je nezasićenim omega-3-masnim kiselinama, što je moglo utjecati na naše rezultate. Robinson i sur. pokazali su znatno smanjenje postprandijalne termogeneze (PPT), koja negativno korelira s osjetljivošću na inzulin u skupini bolesnica s PCOS-om. Iz opisane razlike u energijskoj homeostazi autori pretpostavljaju godišnji višak od 73.500 kJ odnosno 1,9 kg masti koja pridonosi dobivanju na tjelesnoj masi u bolesnica s PCOS-om (147). Pretpostavljamo da je prisutnost polimorfnog alela Ala12, pozitivnim utjecajem na inzulinsku osjetljivost, vjerojatno zaštitna varijanta koja ublažuje hiperinzulinemiju u bolesnica s PCOS-om, koje su nosioci alela (60, 103, 137). Zanimljivo bi bilo istražiti povezanost ovoga polimorfizma s promijenjenom energijskom homeostazom opisanom u bolesnica s PCOS-om.

Možemo zaključiti da polimorfizam Pro12Ala pozitivno utječe na osjetljivost na inzulin u našoj istraživanoj skupini bolesnica s PCOS-om. S obzirom na to da je navedena povezanost opisana samo u skupini bolesnica s PCOS-om, vjerujemo da postoji mogućnost da je ovaj polimorfizam zaštitna varijanta za ublaživanje hiperinzulinemije koja je čest pratioc PCOS-sindroma. Ipak, s obzirom na to da prisutnost genskoga polimorfizma može izolirano objasniti svega 3,7 % varijabilnosti parametra inzulinske rezistencije (R^2) kao i da je njegov utjecaj na smanjenje rizika za PCOS pokazan tek kumulativno u meta-analizi 2674 bolesnice s PCOS-om (141) nužno je provesti dodatne studije koje bi razjasnile utjecaj *PPAR-γ* s drugim genskim varijantama. Također je potrebno dodatno istražiti odnos između *PPAR-γ* polimorfizma i ITM-a uzevši u obzir utjecaj okoliša.

Glavni izazov u naporima otkrivanja gena u podlozi složenih bolesti jest činjenica da svaki polimorfizam tek umjereno pridonosi riziku nastanka bolesti. Napretkom genetičkih istraživanja, pristup gena kandidata biti će zamijenjen testiranjem haplotipova za čitav pretpostavljeni patofiziološki put nastanka bolesti. Time će se testirati međudjelovanje višestrukih genskih varijanti. Pogled u budućnost usmjerena je prema novoj DNA mikročip-tehnologiji (engl. *DNA microarray*). Na DNA-mikročipu je na više tisuća mjesta raspoređeno isto toliko gena. Međutim, dok razvoj novih mikročip-tehnologija ne omogući jeftinu i brzu istodobnu analizu velikog broja gena, ograničeni smo na nastavak otkrivanja novih gena kandidata u podlozi PCOS-a te na provođenje replikacijskih studija kojima bismo potvrdili dosadašnje rezultate. Vjerujemo da su ovi naši rezultati mala kap u slapu nastojanja rješavanja enigme koja se naziva PCOS.

6. ZAKLJUČCI

1) Mikrosatelitni polimorfizam $(CAG)_n$ u egzonu 1 gena *AR* vjerojatno nije ključan čimbenik rizika za razvoj PCOS-a, iako dulje polimorfne varijante značajno pozitivno utječu na serumske koncentracije ukT-a u bolesnica s PCOS-om. Izraženost hiperandrogenizma nije povezana s duljinom CAG-ponavljanja u bolesnica s PCOS-om.

2) Mikrosatelitni polimorfizam $(TAAAA)_n$ u promotoru gena *SHBG* značajno utječe na serumske razine SHBG-a, ali neovisno o PCOS-statusu pa vjerujemo da nije ključan čimbenik za razvoj PCOS-a. Dulje polimorfne varijante predviđaju niže koncentracije SHBG-a, a time izloženost višim vrijednostima slobodnih androgena u bolesnica s PCOS-om.

3) Polimorfizam Asp327Asn gena *SHBG* nije povezan s vrijednostima SHBG-a u serumu. Prisutnost polimorfnog alela Asn327 ne utječe na razinu slobodnih androgena u serumu i ne čini se da ima važnu ulogu u patogenezi PCOS-a.

4) Aleli *INS* VNTR-a III. kategorije nisu povezani s većim rizikom za razvoj PCOS-a te nije potvrđen njihov utjecaj na parametre inzulinske rezistencije.

5) Polimorfizam jedne nukleotide C/T gena *INSR* nije se pokazao značajno povezanim s rizikom nastanka PCOS-a.

6) Polimorfizam jedne nukleotide Gly972Arg gena *IRS-1* nije povezan s većim rizikom za razvoj PCOS-a te nije potvrđen utjecaj polimorfnog alela Arg972 na parametre inzulinske rezistencije.

7) Polimorfizam jedne baze Pro12Ala pozitivno utječe na osjetljivost na inzulin u bolesnica s PCOS-om. Ovaj je polimorfizam vjerojatno zaštitna varijanta za ublaživanje hiperinzulinemije koja često prati PCOS.

8) Nije moguće sa sigurnošću isključiti utjecaj istraživanih polimorfizama na parametre inzulinske rezistencije u bolesnica s PCOS-om povećanoga ITM-a zbog malog broja ispitanica s ITM-om > 25 kg/m^2.

7. SAŽETAK

UVOD: Sindrom policističnih jajnika najčešća je endokrinopatija žena reproduktivne dobi. Učestala pojavnost unutar obitelji pretpostavlja gensku podlogu sindroma. Velika raznolikost fenotipova govori u prilog tome da je PCOS složena genska bolest koja nastaje međudjelovanjem čimbenika okoliša s genskim čimbenicima u podlozi sindroma. Posljednjih je godina proveden velik broj asocijacijskih studija koje su istraživale gensku podlogu PCOS-a, istražujući pri tomu ulogu pretpostavljenih gena kandidata.

CILJ: Cilj ovog istraživanja bio je istražiti povezanost genskih polimorfizama: $(CAG)_n$ *AR*, $(TAAAA)_n$ *SHBG*, Asp327Asn *SHBG*, VNTR *INS*, C/T *INSR,* Gly792Arg *IRS-1* i Pro12Ala *PPAR-γ* s nastankom PCOS-a te s različitim kliničkim i biokemijskim značajkama ovoga sindroma u hrvatskoj populaciji bolesnica.

ISPITANICE I METODE: U studiju smo uključili 214 bolesnica s PCOS-om i 209 kontrolnih ispitanica. Dijagnozu smo postavili na temelju konsenzusa u Rotterdamu. Svakoj ispitanici izmjeren je ITM, omjer struka i bokova, stupanj hirzutizma i akni te ocijenjen poremećaj ciklusa. Određene su serumske vrijednosti FSH-a, LH-a, ukupnoga i slobodnoga testosterona, DHEAS-a, androstendiona, SHBG-a te glukoze i inzulina na tašte. Provedene su molekularnogenetičke analize za određivanje genskih polimorfizama.

REZULTATI: Našli smo značajnu razliku u većini kliničkih i biokemijskih značajki između istraživanih skupina osim za ITM, omjer struka i bokova i glukoze na tašte. Nismo našli da je $(CAG)_n$ *AR*-polimorfizam ključan za razvoj PCOS-a, ali se pokazao značajnim pretkazateljem serumskih vrijednosti ukupnoga testosterona u bolesnica s PCOS-om. Dulji aleli $(TAAAA)_n$ *SHBG* značajno predviđaju niske serumske razine SHBG-a, ali neovisno o PCOS-statusu pa vjerujemo da je ovaj polimorfizam važan čimbenik za nastanak hiperandrogenemije, a ne samoga PCOS-a. Polimorfizam Pro12Ala *PPAR-γ* pozitivno utječe na osjetljivost na inzulin u bolesnica s PCOS-om pa je moguće da je to zaštitna varijanta za ublažavanje hiperinzulinemije koja često prati PCOS. Nismo našli povezanost polimorfizama Asp327Asn *SHBG*, VNTR *INS*, C/T *INSR* i Gly792Arg *IRS-1* s razvojem PCOS-a kao ni njihov utjecaj na parametre inzulinske rezistencije.

ZAKLJUČAK: S obzirom na to da je PCOS složena genska bolest, kod koje pojedinačni gen samo umjereno pridonosi ukupnom riziku za bolest, nalazi ove studije mogli bi pridonijeti sustavnim naporima da se repliciraju pozitivni nalazi prethodno provedenih genetičkih studija.

8. SUMMARY

Polymorphisms of selected genes in polycystic ovary syndrome

INTRODUCTION: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder of the reproductive age women. Familial clustering of the PCOS implicates on genetic background. Different phenotypes of the syndrome suggest that PCOS is a complex genetic disorder wherein a variety of predisposing genes interact with environmental factors to produce the disease. Large numbers of association studies are conducted attempting to discover genes that influence the PCOS using candidate gene approach.

AIM: The aim of the present study was to investigate the association of $(CAG)_n$ *AR*, $(TAAAA)_n$ *SHBG*, Asp327Asn *SHBG*, VNTR *INS*, C/T *INSR,* Gly792Arg *IRS-1* and Pro12Ala *PPAR-γ* genetic polymorphisms with the presence of the PCOS and different clinical and biochemical traits in Croatian women.

STUDY SUBJECTS AND METHODS: The study enrolled 214 women with PCOS and 209 control women. The diagnosis of PCOS was based on Rotterdam consensus criteria. Each subject underwent an evaluation of BMI, WHR, hirsutism, acne and menstrual cycle abnormalities as well as FSH, LH, total and free testosterone, androstendione, DHEAS, SHBG, fasting glucose and fasting insulin. Molecular genetic analyses for the genetic polymorphisms were preformed.

RESULTS: There was a significant difference in clinical and biochemical characteristics of the studied groups except for BMI, WHR and fasting glucose levels. $(CAG)_n$ *AR* polymorphism was not identified as a major determinant of the PCOS, but it is a predictor of the serum total testosterone levels variability in women with the PCOS. Longer $(TAAAA)_n$ SHBG alleles were found to be significant predictors of the lower serum SHBG levels in both groups studied, thus it probably presents a susceptibility polymorphism for hyperandrogenemia but not PCOS itself. Pro12Ala *PPARγ* polymorphism was found to have a positive effect on insulin sensitivity in PCOS patients. This polymorphism could present a protective variant for hyperinsulinemia that frequently accompanies the syndrome. The Asp327Asn *SHBG*, VNTR *INS*, C/T *INSR,* Gly792Arg *IRS-1* polymorphisms were not identified as susceptibility factors for PCOS. Moreover, no association was found between VNTR *INS*, C/T *INSR* and Gly792Arg *IRS-1* polymorphism and parameters of insulin resistance in PCOS patients.

CONCLUSIONS: The present findings may contribute to systematic efforts to replicate positive results of previously conducted genetic studies since PCOS is a complex disease in which each gene contributes modestly to disease risk.

KEY WORDS: polycystic ovary syndrome, $(CAG)_n$ *AR*, $(TAAAA)_n$ *SHBG*, Asp327Asn *SHBG*, VNTR *INS*, C/T *INSR,* Gly792Arg *IRS-1*, Pro12Ala *PPAR-γ*

9. POPIS LITERATURE

1. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. Lancet 2007;370:685-97.

2. Legro RS, Kunselman 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;84:165-9.

3. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. Diabetes Care 1999;22:141-6.

4. Orio F, Palomba S, Colao A. Cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2006;86Suppl 1:S20-1.

5. Azziz R, Marin C, Hoq L, Badamgarav E, Song P. Health care-related economic burden of the polycystic ovary syndrome during the reproductive life span. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:4650-8.

6. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2004;81:19-25.

7. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod 2004;19:41-7.

8. Azziz R. Definition, Diagnosis, and Epidemiology of the Polycystic Ovary Syndrome. U: Azziz R, (ur.) The Polycystic Ovary Syndrome Current Concepts and Clinical Care. New York: Springer; 2007, str. 1-15.

9. Šimunić V. Sindrom policističnih jajnika. Kliničke smjernice. Konsenzus s 2. hrvatskoga simpozija o policističnim jajnicima. Zagreb: FotoSoft; 2006, str. 34.

10. Apter D. Pubertal development in PCOS. U: Azziz R, (ur.) The Polycystic Ovary Syndrome Current Concepts and Clinical Care. New York: Springer; 2007, str. 327-38.

11. Rosenfield RL. Clinical review: Identifying children at risk for polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2007;92:787-96.

12. Ibanez L, Dimartino-Nardi J, Potau N, Saenger P. Premature adrenarche – normal variant or forerunner of adult disease? Endocr Rev 2000;21:671-96.

13. Azziz R, Carmina E, Dewailly D i sur. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:4237-45.

14. Trivax B, Azziz R. Diagnosis of polycystic ovary syndrome. Clin Obstet Gynecol 2007;50:168-77.

15. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Anovulation and the Polycystic Ovary. U: Speroff L, Glass RH, Kase NG, (ur.) Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 6. izd. Philadelphia: Lippincott Wiliams&Wilkins; 1999, str. 487-521.

16. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. J Clin Endocrinol Metab 1961;21:1440-7.

17. Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D. Hirsutism: implications, etiology, and management. Am J Obstet Gynecol 1981;140:815-30.

18. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:2745-9.

19. Carmina E, Rosato F, Janni A, Rizzo M, Longo RA. Extensive clinical experience: relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:2-6.

20. Burke BM, Cunliffe WJ. The assessment of acne vulgaris – the Leeds technique. Br J Dermatol. 1984;111:83-92.

21. Ludwig E. Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occurring in the female sex. Br J Dermatol 1977;97:247-54.

22. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:3666-72.

23. Miller KK, Rosner W, Lee H i sur. Measurement of free testosterone in normal women and women with androgen deficiency: comparison of methods. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:525-33.

24. Legro RS. Clinical Evaluation of PCOS. U: Azziz R, (ur.) The Polycystic Ovary Syndrome Current Concepts and Clinical Care. New York: Springer; 2007, str. 17-27.

25. Jonard S, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Pigny P, Decanter C, Dewailly D. Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? Hum Reprod 2003;18:598-603.

26. Balen AH, Laven JS, Tan SL, Dewailly D. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. Hum Reprod Update 2003;9:505-14.

27. Ehrmann DA, Liljenquist DR, Kasza K, Azziz R, Legro RS, Ghazzi MN. Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:48-53.

28. Goodarzi M. Genetics of PCOS. U: Azziz R, (ur.) The Polycystic Ovary Syndrome Current Concepts and Clinical Care. New York: Springer; 2007, str. 29-42.

29. Chang RJ. The reproductive phenotype in polycystic ovary syndrome. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2007;3:688-95.

30. Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW, Franks S. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab 1994;79:1158-65.

31. Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, 3rd, McAllister JM. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. Mol Endocrinol 1999;13:946-57.

32. Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, i sur. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. Lancet 2003;(27)362:1017-21.

33. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. J Clin Invest 1998 15;101:2622-9.

34. Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:2951-6.

35. Jonard S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. Hum Reprod Update 2004;10:107-17.

36. Willis DS, Watson H, Mason HD, Galea R, Brincat M, Franks S. Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:3984-91.

37. Rice S, Christoforidis N, Gadd C i sur. Impaired insulin-dependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries. Hum Reprod 2005;20:373-81.

38. Blank SK, McCartney CR, Marshall JC. The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. Hum Reprod Update 2006;12:351-61.

39. Wu XK, Zhou SY, Liu JX i sur. Selective ovary resistance to insulin signaling in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2003;80:954-65.

40. Baillargeon J. Insulin Action in Polycystic Ovary Syndrome: In Vivo and In Vitro. U: Azziz R, (ur.) The Polycystic Ovary Syndrome Current Concepts and Clinical Care. New York: Springer; 2007, str. 43-68.

41. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. Endocr Rev 1997;18:774-800.

42. Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. Trends Mol Med 2006;12:324-32.

43. Pasquali R PL, Diamanti-Kandarakis E, Gambineri A. Role of Obesity and Adiposity in PCOS. U: Azziz R, (ur.) The Polycystic Ovary Syndrome Current Concepts and Clinical Care. New York: Springer; 2007, str. 85-97.

44. Carmina E, Orio F, Palomba S i sur. Evidence for altered adipocyte function in polycystic ovary syndrome. Eur J Endocrinol 2005;152:389-94.

45. Orio F, Jr., Palomba S, Cascella T i sur. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:2619-23.

46. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, San Millan JL. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. Endocr Rev 2005;26:251-82.

47. Unluturk U, Harmanci A, Kocaefe C, Yildiz BO. The Genetic Basis of the Polycystic Ovary Syndrome: A Literature Review Including Discussion of PPAR-gamma. PPAR Res. 2007;2007:49109.

48. Kahsar-Miller MD, Nixon C, Boots LR, Go RC, Azziz R. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. Fertil Steril 2001;75:53-8.

49. Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:2100-4.

50. Legro RS, Bentley-Lewis R, Driscoll D, Wang SC, Dunaif A. Insulin resistance in the sisters of women with polycystic ovary syndrome: association with hyperandrogenemia rather than menstrual irregularity. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:2128-33.

51. Seminara SB, Crowley WF, Jr. Genetic approaches to unraveling reproductive disorders: examples of bedside to bench research in the genomic era. Endocr Rev 2002;23:382-92.

52. Boraska V. Genetska istraživanja složenih bolesti. Dostupno na: http://genom.mefst.hr/Globaldizajn/katedre/med_biologija/izborni/Genetika_sec_bol_izborni.pdf Zadnji pristup: 17.05.2011.

53. Passarge E. Color Atlas of Genetics. 3. izd. New York: Thieme; 2006, str. 496.

54. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. Nucleic Acids Res 1994;(11)22:3181-6.

55. Hogeveen KN, Talikka M, Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin promoter activity is influenced by a (TAAAA)n repeat element within an Alu sequence. J Biol Chem 2001;276:36383-90.

56. Cousin P, Dechaud H, Grenot C, Lejeune H, Pugeat M. Human variant sex hormone-binding globulin (SHBG) with an additional carbohydrate chain has a reduced clearance rate in rabbit. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:235-40.

57. Bell GI, Selby MJ, Rutter WJ. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. Nature 1982;295:31-5.

58. Siegel S, Futterweit W, Davies TF i sur. 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;78:1240-3.

59. Ura S, Araki E, Kishikawa H i sur. Molecular scanning of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene in Japanese patients with NIDDM: identification of five novel polymorphisms. Diabetologia 1996;39:600-8.

60. Hara M, Alcoser SY, Qaadir A, Beiswenger KK, Cox NJ, Ehrmann DA. Insulin resistance is attenuated in women with polycystic ovary syndrome with the Pro(12)Ala polymorphism in the PPAR-gamma gene. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:772-5.

61. Azziz R. Polycystic ovary syndrome is a family affair. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:1579-81.

62. Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X-chromosome. Science 1988;240:327-30.

63. Vottero A, Stratakis CA, Ghizzoni L, Longui CA, Karl M, Chrousos GP. Androgen receptor-mediated hypersensitivity to androgens in women with nonhyperandrogenic hirsutism: skewing of X-chromosome inactivation. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:1091-5.

64. 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;87:161-5.

65. Jaaskelainen J, Korhonen S, Voutilainen R, Hippelainen M, Heinonen S. Androgen receptor gene CAG length polymorphism in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2005;83:1724-8.

66. Kim JJ, Choung SH, Choi YM, Yoon SH, Kim SH, Moon SY. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2008;90:2318-23.

67. Mifsud A, Ramirez S, Yong EL. Androgen receptor gene CAG trinucleotide repeats in anovulatory infertility and polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:3484-8.

68. Mohlig M, Jurgens A, Spranger J i sur. The androgen receptor CAG repeat modifies the impact of testosterone on insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. Eur J Endocrinol 2006;155:127-30.

69. Shah NA, Antoine HJ, Pall M, Taylor KD, Azziz R, Goodarzi MO. Association of androgen receptor CAG repeat polymorphism and polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:1939-45.

70. Xita N, Georgiou I, Lazaros L, Psofaki V, Kolios G, Tsatsoulis A. The role of sex hormone-binding globulin and androgen receptor gene variants in the development of polycystic ovary syndrome. Hum Reprod 2008;23:693-8.

71. Berube D, Seralini GE, Gagne R, Hammond GL. Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-p13). Cytogenet Cell Genet 1990;54:65-7.

72. Selby C. Sex hormone-binding globulin: origin, function and clinical significance. Ann Clin Biochem 1990;27:532-41.

73. Xita N, Tsatsoulis A. Genetic variants of sex hormone-binding globulin and their biological consequences. Mol Cell Endocrinol 2010;316:60-5.

74. Cousin P, Calemard-Michel L, Lejeune H i sur. Influence of SHBG gene pentanucleotide TAAAA repeat and D327N polymorphism on serum sex hormone-binding globulin concentration in hirsute women. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:917-24.

75. Ferk P, Teran N, Gersak K. The (TAAAA)n microsatellite polymorphism in the SHBG gene influences serum SHBG levels in women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod 2007;22:1031-6.

76. Turk A, Kopp P, Colangelo LA, Urbanek M, Wood K, Liu K, i sur. Associations of serum sex hormone binding globulin (SHBG) levels with SHBG gene polymorphisms in the CARDIA Male Hormone Study. Am J Epidemiol 2008;167:412-8.

77. Eriksson AL, Lorentzon M, Mellstrom D i sur. SHBG gene promoter polymorphisms in men are associated with serum sex hormone-binding globulin, androgen and androgen metabolite levels, and hip bone mineral density. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:5029-37.

78. Vanbillemont G, Bogaert V, De Bacquer D i sur. Polymorphisms of the SHBG gene contribute to the interindividual variation of sex steroid hormone blood levels in young, middle-aged and elderly men. Clin Endocrinol 2009;70:303-10.

79. Haiman CA, Riley SE, Freedman ML, Setiawan VW, Conti DV, Le Marchand L. Common genetic variation in the sex steroid hormone-binding globulin (SHBG) gene and circulating SHBG levels among postmenopausal women: the Multiethnic Cohort. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:2198-204.

80. Cui Y, Shu XO, Cai Q i sur. Association of breast cancer risk with a common functional polymorphism (Asp327Asn) in the sex hormone-binding globulin gene. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14:1096-101.

81. Costantino L, Catalano MG, Frairia R i sur. Molecular mechanisms of the D327N SHBG protective role on breast cancer development after estrogen exposure. Breast Cancer Res Treat 2009;114:449-56.

82. McKeigue P, Wild S. Association of insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome. Lancet 1997;349:1771-2.

83. Ovalle F, Azziz R. Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. Fertil Steril 2002;77:1095-105.

84. Waterworth DM, Bennett ST, Gharani N i sur. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. Lancet 1997;349:986-90.

85. Kennedy GC, German MS, Rutter WJ. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. Nat Genet 1995;9:293-8.

86. Ferk P, Perme MP, Gersak K. Insulin gene polymorphism in women with polycystic ovary syndrome. J Int Med Res 2008;36:1180-7.

87. Talbot JA, Bicknell EJ, Rajkhowa M, Krook A, O'Rahilly S, Clayton RN. Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovarian syndrome. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:1979-83.

88. Taylor SI, Cama A, Accili D, Barbetti F, Quon MJ, de la Luz Sierra M, i sur. Mutations in the insulin receptor gene. Endocr Rev 1992;13:566-95.

89. Chen ZJ, Shi YH, Zhao YR i sur. [Correlation between single nucleotide polymorphism of insulin receptor gene with polycystic ovary syndrome]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 2004;39:582-5.

90. Lee EJ, Oh B, Lee JY, Kimm K, Lee SH, Baek KH. A novel single nucleotide polymorphism of INSR gene for polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2008;89:1213-20.

91. Lee EJ, Yoo KJ, Kim SJ, Lee SH, Cha KY, Baek KH. Single nucleotide polymorphism in exon 17 of the insulin receptor gene is not associated with polycystic ovary syndrome in a Korean population. Fertil Steril 2006;86:380-4.

92. Mukherjee S, Shaikh N, Khavale S i sur. Genetic variation in exon 17 of INSR is associated with insulin resistance and hyperandrogenemia among lean Indian women with polycystic ovary syndrome. Eur J Endocrinol 2009;160:855-62.

93. Dilek S, Ertunc D, Tok EC, Erdal EM, Aktas A. Association of Gly972Arg variant of insulin receptor substrate-1 with metabolic features in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2005;84:407-12.

94. Ertunc D, Tok EC, Aktas A, Erdal EM, Dilek S. The importance of IRS-1 Gly972Arg polymorphism in evaluating the response to metformin treatment in polycystic ovary syndrome. Hum Reprod 2005;20:1207-12.

95. El Mkadem SA, Lautier C, Macari F i sur. 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;50:2164-8.

96. Ioannidis A, Ikonomi E, Dimou NL, Douma L, Bagos PG. Polymorphisms of the insulin receptor and the insulin receptor substrates genes in polycystic ovary syndrome: a Mendelian randomization meta-analysis. Mol Genet Metab 2010;99:174-83.

97. Jellema A, Zeegers MP, Feskens EJ, Dagnelie PC, Mensink RP. Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate-1 gene and association with type 2 diabetes: a meta-analysis of 27 studies. Diabetologia 2003;46:990-5.

98. Villuendas G, Botella-Carretero JI, Roldan B, Sancho J, Escobar-Morreale HF, San Millan JL. Polymorphisms in the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene and the insulin receptor substrate-2 (IRS-2) gene influence glucose homeostasis and body mass index in women with polycystic ovary syndrome and non-hyperandrogenic controls. Hum Reprod 2005;20:3184-91.

99. Glintborg D, Andersen M. Thiazolinedione treatment in PCOS – an update. Gynecol Endocrinol 2010;26:791-803.

100. Veldhuis JD, Zhang G, Garmey JC. Troglitazone, an insulin-sensitizing thiazolidinedione, represses combined stimulation by LH and insulin of de novo androgen biosynthesis by thecal cells in vitro. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:1129-33.

101. Yen CJ, Beamer BA, Negri C i sur. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR-gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. Biochem Biophys Res Commun 1997;241:270-4.

102. Korhonen S, Heinonen S, Hiltunen M i sur. Polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod 2003;18:540-3.

103. Tok EC, Aktas A, Ertunc D, Erdal EM, Dilek S. Evaluation of glucose metabolism and reproductive hormones in polycystic ovary syndrome on the basis of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma2 Pro12Ala genotype. Hum Reprod 2005;20:1590-5.

104. Yilmaz M, Ergun MA, Karakoc A, Yurtcu E, Cakir N, Arslan M. Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in women with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol 2006;22:336-42.

105. Yilmaz M, Ergun MA, Karakoc A, Yurtcu E, Yetkin I, Ayvaz G, i sur. Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in first-degree relatives of subjects with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol 2005;21:206-10.

106. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 1985;28:412-9.

107. Ascaso JF, Pardo S, Real JT, Lorente RI, Priego A, Carmena R. Diagnosing insulin resistance by simple quantitative methods in subjects with normal glucose metabolism. Diabetes Care 2003;26:3320-5.

108. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2. izd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

109. Fujii K, Okiura T, Nishimura K, Orimoto C, Nishimukai H. Short tandem repeat typing in exon 1 of the androgen receptor gene. Leg Med 2003;5Suppl 1:S201-3.

110. Lucassen AM, Julier C, Beressi JP i sur. Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. Nat Genet 1993;4:305-10.

111. Carmina E, Koyama T, Chang L, Stanczyk FZ, Lobo RA. Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? Am J Obstet Gynecol 1992;167:1807-12.

112. Gambineri A, Pelusi C, Manicardi E i sur. Glucose intolerance in a large cohort of mediterranean women with polycystic ovary syndrome: phenotype and associated factors. Diabetes 2004;53:2353-8.

113. Šimunić V. Kronične hiperandrogene anovulacije – sindrom policističnih jajnika (PCOS). U: Šimunić V, (ur.) Ginekologija. Zagreb: Naklada Ljevak; 2001, str. 205 – 15.

114. Ferk P, Perme MP, Teran N, Gersak K. Androgen receptor gene (CAG)n polymorphism in patients with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2008;90:860-3.

115. Dasgupta S, Sirisha PV, Neelaveni K i sur. Androgen receptor CAG repeat polymorphism and epigenetic influence among the south Indian women with Polycystic Ovary Syndrome. PLoS One 2010;5:12401.

116. Lyon MF. The William Allan memorial award address: X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes. Am J Hum Genet 1988;42:8-16.

117. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X-chromosome inactivation. Am J Hum Genet 1992;51:1229-39.

118. Spencer JB, Klein M, Kumar A, Azziz R. The age-associated decline of androgens in reproductive age and menopausal Black and White women. J Clin Endocrinol Metab 2007;92:4730-3.

119. Ibanez L, Ong KK, Mongan N i sur. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in the development of ovarian hyperandrogenism. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:3333-8.

120. Westberg L, Baghaei F, Rosmond R i sur. Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor beta gene are associated with androgen levels in women. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:2562-8.

121. Lee HJ, Chang C. Recent advances in androgen receptor action. Cell Mol Life Sci 2003;60:1613-22.

122. Calvo RM, Asuncion M, Sancho J, San Millan JL, Escobar-Morreale HF. 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;85:1735-40.

123. Xita N, Tsatsoulis A, Chatzikyriakidou A, Georgiou I. Association of the (TAAAA)n repeat polymorphism in the sex hormone-binding globulin (SHBG) gene with polycystic ovary syndrome and relation to SHBG serum levels. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:5976-80.

124. Bendlova B, Zavadilova J, Vankova M i sur. Role of D327N sex hormone-binding globulin gene polymorphism in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. J Steroid Biochem Mol Biol 2007;104:68-74.

125. Dunning AM, Dowsett M, Healey CS i sur. Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women. J Natl Cancer Inst 2004;96:936-45.

126. Calvo RM, Telleria D, Sancho J, San Millan JL, Escobar-Morreale HF. Insulin gene variable number of tandem repeats regulatory polymorphism is not associated with hyperandrogenism in Spanish women. Fertil Steril 2002;77:666-8.

127. Powell BL, Haddad L, Bennett A i sur. Analysis of multiple data sets reveals no association between the insulin gene variable number tandem repeat element and polycystic ovary syndrome or related traits. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:2988-93.

128. Vankova M, Vrbikova J, Hill M, Cinek O, Bendlova B. Association of insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome. Ann N Y Acad Sci 2002;967:558-65.

129. Xu Y, Wei Z, Zhang Z i sur. No association of the insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome in a Han Chinese population. Reprod Biol Endocrinol 2009;7:141.

130. Michelmore K, Ong K, Mason S i sur. Clinical features in women with polycystic ovaries: relationships to insulin sensitivity, insulin gene VNTR and birth weight. Clin Endocrinol 2001;55:439-46.

131. Unsal T, Konac E, Yesilkaya E i sur. Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP1A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome. J Assist Reprod Genet 2009;26:205-16.

132. Lin TC, Yen JM, Gong KB i sur. Abnormal glucose tolerance and insulin resistance in polycystic ovary syndrome amongst the Taiwanese population- not correlated with insulin receptor substrate-1 Gly972Arg/Ala513Pro polymorphism. BMC Med Genet 2006;7:36.

133. Valdes P, Cerda A, Barrenechea C, Kehr M, Soto C, Salazar LA. No association between common Gly972Arg variant of the insulin receptor substrate-1 and polycystic ovary syndrome in Southern Chilean women. Clin Chim Acta 2008;390:63-6.

134. Sir-Petermann T, Perez-Bravo F, Angel B, Maliqueo M, Calvillan M, Palomino A. G972R polymorphism of IRS-1 in women with polycystic ovary syndrome. Diabetologia 2001;44:1200-1.

135. Frederiksen L, Brodbaek K, Fenger M i sur. Comment: studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:3989-92.

136. Antoine HJ, Pall M, Trader BC, Chen YD, Azziz R, Goodarzi MO. Genetic variants in peroxisome proliferator-activated receptor gamma influence insulin resistance and testosterone levels in normal women, but not those with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2007;87:862-9.

137. Hahn S, Fingerhut A, Khomtsiv U i sur. The peroxisome proliferator activated receptor gamma Pro12Ala polymorphism is associated with a lower hirsutism score and increased insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol 2005;62:573-9.

138. Orio F, Jr., Palomba S, Cascella T i sur. Lack of an association between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene Pro12Ala polymorphism and adiponectin levels in the polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:5110-5.

139. Wang Y, Wu X, Cao Y, Yi L, Fan H, Chen J. Polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and its coactivator-1alpha genes in Chinese women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2006;85:1536-40.

140. Xita N, Lazaros L, Georgiou I, Tsatsoulis A. The Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene is not associated with the polycystic ovary syndrome. Hormones 2009;8:267-72.

141. San-Millan JL, Escobar-Morreale HF. The role of genetic variation in peroxisome proliferator-activated receptors in the polycystic ovary syndrome (PCOS): an original case-control study followed by systematic review and meta-analysis of existing evidence. Clin Endocrinol 2010;72:383-92.

142. Auwerx J, Cock TA, Knouff C. PPAR-gamma: a thrifty transcription factor. Nucl Recept Signal 2003;1:e006.

143. Knouff C, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. Endocr Rev 2004;25:899-918.

144. Luan J, Browne PO, Harding AH, Halsall DJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK, i sur. Evidence for gene-nutrient interaction at the PPAR-gamma locus. Diabetes 2001;50:686-9.

145. Franks PW, Luan J, Browne PO i sur. Does peroxisome proliferator-activated receptor-gamma genotype (Pro12ala) modify the association of physical activity and dietary fat with fasting insulin level? Metabolism 2004;53:11-6.

146. Ranilovic J, Markovina J, Znidar K, Colic Baric I. Attitudes to healthy eating among a representative sampling of Croatian adults: a comparison with Mediterranean countries. Int J Food Sci Nutr 2009;60Suppl 7:11-29.

147. Robinson S, Chan SP, Spacey S, Anyaoku V, Johnston DG, Franks S. Postprandial thermogenesis is reduced in polycystic ovary syndrome and is associated with increased insulin resistance. Clin Endocrinol 1992;36:537-43.

10. ŽIVOTOPIS AUTORA

Lana Škrgatić rođena je 1976. godine u Zagrebu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Zagrebu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2000. godine. Obvezni pripravnički staž odradila je u Klinici za dječje bolesti u Klaićevoj ulici te je 2001. godine položila državni ispit. Od 2001. godine radi kao znanstveni novak – asistent u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a i Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a u svibnju 2011. godine izabrana je u suradničko zvanje asistenta na Katedri za ginekologiju i opstetriciju Medicinskoga fakulteta u kumulativnom radnom odnosu. Završila je znanstveni poslijediplomski studij "Biomedicina i zdravstvo" na Medicinskome fakultetu u Zagrebu. Kao stipendist Ministarstva školstva, znanosti i športa Republike Slovenije, 2007. godine boravi tri mjeseca na Zavodu za medicinsku genetiku Klinike za ginekologiju i opstetriciju Medicinskoga centra u Ljubljani.

Specijalistički ispit iz ginekologije i opstetricije položila je 2009. godine i od tada radi na Zavodu za ginekološku kirurgiju i uroginekologiju, Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a i Medicinskoga fakulteta u Zagrebu.

Koautor je četriju radova koji se citiraju u CC-u te sedam poglavlja u knjigama i nastavnim tekstovima.

Udana je i majka dvojice sinova.