

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



VESNA BEZAK

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV V GENU ZA LPIN 1 Z INZULINSKO
REZISTENCO PRI BOLNICAH S SINDROMOM POLICISTIČNIH JAJČNIKOV**

**ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN LPIN1 GENE AND INSULIN
RESISTANCE IN PATIENTS WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v laboratorijih Katedre za klinično biokemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc, mag.farm. in somentorstvom asist. mag. Barbare Mlinar, mag.farm.. Merjenje biokemičnih in kliničnih parametrov so opravili na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Kliničnega centra. Preiskovanke so pregledali na Ginekološki kliniki in na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove v Kliničnem centru.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Janji Marc, mag. farm. in somentorici asist. mag. Barbari Mlinar, mag.farm. za vso strokovno pomoč in odlično vodenje pri izdelavi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc, mag.farm. in somentorstvom asist. mag. Barbare Mlinar, mag.farm..

Vesna Bezak

Predsednik komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Ljubljana, 2008

KAZALO

KAZALO PREGLEDNIC	iii
KAZALO SLIK	iv
POVZETEK	v
ABSTRACT	vi
SEZNAM OKRAJŠAV	vii
1 UVOD	1
1.1 Inzulín in prenos signala	1
1.2 Inzulínska rezistenca	3
1.2.1 Mehanizmi nastanka inzulínske rezistence	4
1.3 Sindrom policističnih jajčnikov	6
1.3.1 Patofiziologija PCOS	8
1.4 Lipin 1	10
1.4.1 Lipin 1 kot encim	10
1.4.2 Lipin 1 in lipodistrofija	11
1.4.3 Vloga lipina 1 v adipogenezi	11
1.4.4 Vloga lipina 1 v jetrih	12
1.4.5 Regulacija lipina 1 preko inzulína	12
1.4.6 Transgeni mišji modeli	13
1.4.7 Izooblike lipina 1	14
1.4.8 Debelost, IR in lipin 1	14
1.4.9 Gen LPIN1	15
1.4.9.1 Polimorfizma SNPI in SNP17	15
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Opis preiskovank	17
3.2 Opis vzorcev DNA in njihovo vrednotenje	17
3.2.1 Določanje koncentracije DNA z UV spektrofotometrično metodo	18
3.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času	19
3.3.1 Genotipizacija z metodo alelne diskriminacije	21
3.3.1.1 Genotipizacija za SNPI in SNP17	22
3.4 Statistična analiza	26

4 REZULTATI IN RAZPRAVA	28
4.1 Eksperimentalno delo	28
4.1.1 Genotipizacija polimorfizma SNP1	28
4.1.2 Genotipizacija polimorfizma SNP17	31
4.2 Ocena klinične pomembnosti polimorfizmov SNP1 in SNP17	34
4.2.1 Ugotavljanje skladnosti s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem	34
4.2.2 Pogostost polimorfizmov SNP1 in SNP17 pri bolnicah s PCOS ter zdravih preiskovankah.....	35
4.2.3 Ugotavljanje povezanosti polimorfizmov SNP1 in SNP17 s kliničnimi in biokemičnimi kazalci IR in PCOS	39
4.2.4 Ugotavljanje vpliva diplotipov na klinične in biokemične kazalce IR in PCOS	47
5 SKLEPI.....	54
6 LITERATURA	55

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Presnovni učinki inzulina	2
Preglednica II: Osnovne značilnosti dveh polimorfizmov v genu za lipin 1.	15
Preglednica III: Sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo za SNP1 s PCR v realnem času.	24
Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo za SNP17 s PCR v realnem času.	25
Preglednica V: Temperaturna shema reakcije PCR v realnem času za oba polimorfizma.	25
Preglednica VI: Rezultati alelne diskriminacije za polimorfizem SNP1.....	30
Preglednica VII: Rezultati alelne diskriminacije za polimorfizem SNP17.....	32
Preglednica VIII: Genotipske frekvence določene na populaciji 371 preiskovank za oba polimorfizma.....	33
Preglednica IX: Število opaženih in pričakovanih genotipov pri bolnicah in zdravih preiskovankah za polimorfizem SNP1.	34
Preglednica X: Število opaženih in pričakovanih genotipov pri bolnicah in zdravih preiskovankah za polimorfizem SNP17.	35
Preglednica XI: Genotipske frekvence bolnic s PCOS in zdravih preiskovank za oba polimorfizma.....	36
Preglednica XII: Alelne frekvence bolnic s PCOS in zdravih preiskovank za oba polimorfizma.	37
Preglednica XIII: Genotipske frekvence bolnic s PCOS in IR in zdravih preiskovank brez PCOS in IR za oba polimorfizma.....	38
Preglednica XIV: Testiranje porazdelitve podatkov s Kolmogorov-Smirnovim testom.....	40
Preglednica XV: Rezultati neparametričnega testa po Kruskal-Wallisovemu za SNP1 ter primerjave posameznih genotipov z Mann-Whitneyevim testom.	41
Preglednica XVI: Rezultati neparametričnega Mann-Whitneyevega testa za SNP17.	44
Preglednica XVII: Haplotipske frekvence in opaženi diplotipi.	48
Preglednica XVIII: Rezultati testa po Kruskal-Wallisovemu o vplivu diplotipov na klinične kazalce.....	49
Preglednica XIX: Rezultati primerjave posameznih diplotipov z Mann-Whitneyevim testom za inzulin na tešče, glukozo na tešče in LDL-holesterol.	49
Preglednica XX: Mediane in zgornji/spodnji kvartili za inzulin na tešče, glukozo na tešče ter LDL-holesterol.....	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Inzulinsko signaliziranje.	2
Slika 2: Primerjava normalnih in policističnih jajčnikov.	8
Slika 3: Motnja v jajčniku pri PCOS.	9
Slika 4: Defosforilacija fosfatidata.	10
Slika 5: Humana proteina lipin 1 α in lipin 1 β	14
Slika 6: Tehnologija NanoDrop.	18
Slika 7: Potek PCR.	19
Slika 8: Načini detekcije produktov pri PCR v realnem času.	20
Slika 9: Metoda TaqMan.	22
Slika 10: Nukleotidno zaporedje dela introna 1 v genu <i>LPINI</i>	23
Slika 11: Nukleotidno zaporedje dela introna 17 v genu <i>LPINI</i>	23
Slika 12: Grafični prikaz rezultata reakcije PCR v realnem času za homozigota C/C polimorfizma SNP1.	28
Slika 13: Grafični prikaz rezultata reakcije PCR v realnem času za heterozigota C/T polimorfizma SNP1.	29
Slika 14: Grafični prikaz rezultata reakcije PCR v realnem času za mutiranega homozigota T/T polimorfizma SNP1.	29
Slika 15: Grafični prikaz rezultatov alelne diskriminacije za polimorfizem SNP1.	30
Slika 16: Grafični prikaz rezultata reakcije PCR v realnem času za homozigota C/C polimorfizma SNP17.	31
Slika 17: Grafični prikaz rezultata reakcije PCR v realnem času za heterozigota C/T polimorfizma SNP17.	31
Slika 18: Grafični prikaz rezultata reakcije PCR v realnem času za mutiranega homozigota T/T polimorfizma SNP17.	32
Slika 19: Grafični prikaz rezultatov alelne diskriminacije za polimorfizem SNP17.	33
Slika 20: Genotipske frekvence za oba polimorfizma.	36
Slika 21: Alelne frekvence za oba polimorfizma.	37
Slika 22: Mediane inzulina na tešče glede na diplotip.	50
Slika 23: Mediane glukoze na tešče glede na diplotip.	51
Slika 24: Mediane LDL-holesterola glede na diplotip.	51

POVZETEK

Sindrom policističnih jajčnikov (PCOS) je endokrina motnja, ki prizadene od 4% do 12% žensk v rodnem obdobju. Njeni glavni značilnosti sta hiperandrogenizem in kronična anovulacija. Velik delež bolnic s PCOS ima inzulinsko rezistenco (IR), ki označuje stanje z zmanjšano odzivnostjo tkiv na inzulin in lahko nastane zaradi različnih okvar na katerikoli stopnji inzulinskega signaliziranja. Predvidevajo, da je IR eden od pomembnih vzrokov za razvoj kroničnih obolenj, kot so sladkorna bolezen tipa 2, kardiovaskularna obolenja in PCOS.

Protein lipin 1 ima pomembno vlogo v diferenciaciji adipocitov, kjer omogoča indukcijo ključnih adipogenih genov. Poleg tega je pomemben tudi pri presnovi v zrelih adipocitih, kjer kot od Mg^{2+} odvisna fosfataza fosfatidne kisline sodeluje v lipogenezi. *LPIN1* je kandidatni gen za debelost, IR in sladkorno bolezen tipa 2.

V naši raziskavi smo preučevali povezanost polimorfizmov SNP1 (IVS1+3341C>T, rs11693809) in SNP17 (IVS17-228C>T, rs2716610) v genu za lipin 1 s kliničnimi in biokemičnimi kazalci debelosti, IR ter PCOS na populaciji 222 bolnic s PCOS in 149 zdravih preiskovank. DNA preiskovank smo pomnožili in genotipizirali z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Ugotovili smo, da se genotipske in alelne frekvence za posamezen polimorfizem med bolnicami s PCOS in zdravimi preiskovankami značilno ne razlikujejo. Polimorfizem SNP1 je bil pri bolnicah s PCOS mejno značilno povezan z indeksom telesne mase ($p = 0,089$); pri zdravih preiskovankah pa je bil značilno povezan z LDL-holesterolom ($p = 0,041$). Mejno značilna razlika je bila pri bolnicah s PCOS prisotna v vrednosti inzulina na tešče ($p = 0,088$), indeksa HOMA ($p = 0,057$), SHBG ($p = 0,063$) in DHEAS ($p = 0,072$) v serumu med posameznima skupinama genotipov. Bolnice s PCOS, ki so nosilke heterozigotnega genotipa polimorfizma SNP1, imajo tako manj ugoden fenotip. Alel T polimorfizma SNP17 je bil značilno povezan z višjimi vrednostmi inzulina na tešče ($p = 0,046$) ter indeksa HOMA ($p = 0,032$) pri bolnicah s PCOS in IR; značilno je bil tudi povezan z višjimi koncentracijami trigliceridov v serumu ($p = 0,039$) pri zdravih preiskovankah. Bolnice s PCOS in IR ter zdrave preiskovanke z alelom T imajo metabolično manj ugoden fenotip. Polimorfizma SNP1 in SNP17 sta v nizkem vezavnem neravnovesju ($D' = 0,16$). Diplotipa, ki sta homozigotna za mutirano obliko polimorfizma SNP1, imata značilno nižje serumske koncentracije inzulina na tešče ($p = 0,039$) in LDL-holesterola ($p = 0,021$) oziroma glukoze na tešče ($p = 0,028$) v primerjavi z diplotipoma, ki sta heterozigotna za ta polimorfizem, in torej predstavljata manjše tveganje za nastanek motenj glukozne homeostaze ter bolezni srca in ožilja.

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrine disorder that affects 4% to 12% of women of reproductive age. Its main clinical features are hyperandrogenism and chronic anovulation. Insulin resistance (IR) is common amongst patients with PCOS. IR is characterized by attenuated response of tissues to insulin action and can be due to impairments on any level of insulin signalling. It is one of most important factors of pathological states, such as diabetes mellitus type 2, cardiovascular disease and PCOS.

Lipin 1 protein has a critical role in adipocyte differentiation enabling induction of key adipogenic genes. It also plays an important role in the function of mature adipocytes in which it takes part in lipogenesis as Mg^{2+} -dependent phosphatidic acid phosphatase. *LPINI* is a candidate gene for obesity, IR and diabetes mellitus type 2.

In our research we studied the association between polymorphisms SNP1 (rs11693809) and SNP17 (rs2716610) in *LPINI* gene with clinical and biochemical markers of obesity, IR and PCOS in group of 371 women. DNA samples were amplified and genotyped using real-time polymerase chain reaction technology. Genotypic and allelic frequencies for individual polymorphism did not differ between patients with PCOS and healthy control women. There was a borderline significant association of polymorphism SNP1 with body mass index ($p = 0,089$) in patients with PCOS and a significant association with LDL cholesterol levels ($p = 0,041$) in healthy control women. We found a borderline significant difference in values of fasting blood insulin ($p = 0,088$), HOMA index ($p = 0,057$), serum SHBG ($p = 0,063$) and DHEAS ($p = 0,072$) between two genotype groups in patients with PCOS. Women with PCOS carrying polymorphism SNP1 in heterozygous state have a less favorable phenotype. The T allele of polymorphism SNP17 was significantly associated with higher fasting blood insulin values ($p = 0,046$) and HOMA index ($p = 0,032$) in insulin resistant patients with PCOS. It was also significantly associated with higher serum triglycerides concentration ($p = 0,039$) in healthy control women. These two groups of patients carrying T allele have a less favorable metabolic phenotype. Studied polymorphisms were in low degree of linkage disequilibrium ($D' = 0,16$). Two diplotypes carrying T allele of polymorphism SNP1 in homozygous state had significantly lower fasting blood insulin ($p = 0,039$), LDL cholesterol ($p = 0,021$) and fasting blood glucose values ($p = 0,028$) compared to diplotypes carrying the same polymorphism in heterozygous state and therefore had a lower risk for developing cardiovascular disease and disorders affecting glucose homeostasis.

SEZNAM OKRAJŠAV

AK	aminokislina
ASRM	American society for reproductive medicine
BMI	indeks telesne mase
C/EBP	beljakovina, ki se veže na CCAAT/ojačevalec (angl. CCAAT/enhancer binding protein)
DAG	diacilglicerol
DHEAS	dehidroepiandrosteron-sulfat
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfat
ESHRE	European society for human reproduction and embryology
Fld	distrofija z zamaščenimi jetri (angl. fatty liver dystrophy)
FRET	fluorescenčni resonančni prenos energije (angl. fluorescence resonance energy transfer)
GLUT 4	glukočni transporter 4
GOD-PAP	glukoza-oksidazna PAP metoda
HDL	lipoproteini visoke gostote
HOMA	indeks inzulinske rezistence (angl. homeostatic model assessment)
IL-6	interlevkin 6
IR	inzulinska rezistenca
IRMA	imunoradiometrični test
IRS	inzulinski receptorski substrat
LDL	lipoproteini nizke gostote
LH	luteinizirajoči hormon
MAP-kinaza	od mitogena aktivirana protein kinaza (angl. mitogen activated protein-kinase)
MGB	vezalec v malem žlebu
mTOR	tarča rapamicina pri sesalcih (angl. mammalian target of rapamycin)
NICHD	National institute of child health and human development
NIH	National institutes of health
PAP	fosfataza fosfatidne kisline (angl. phosphatidic acid phosphatase)
PCOS	sindrom policističnih jajčnikov
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PI3K	fosfatidil-inozitol-3-kinaza

PKB	protein kinaza B
PKC	protein kinaza C
PMK	proste maščobne kisline
PPAR	s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor
QUICKI	indeks inzulinske občutljivosti (angl. quantitative insulin sensitivity check index)
RIA	radioimunski test
Ser	serin
SHBG	vezalni globulin za spolne hormone (angl. sex hormone-binding globulin)
SNP	polimorfizem enega nukleotida (angl. single nucleotide polymorphism)
SOCS	supresor citokinskega signaliziranja (angl. suppressor of cytokine signalling)
TAG	triacilgliceroli, trigliceridi
Thr	treonin
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α (angl. tumour necrosis factor α)
U	mednarodna enota za inzulin

1 UVOD

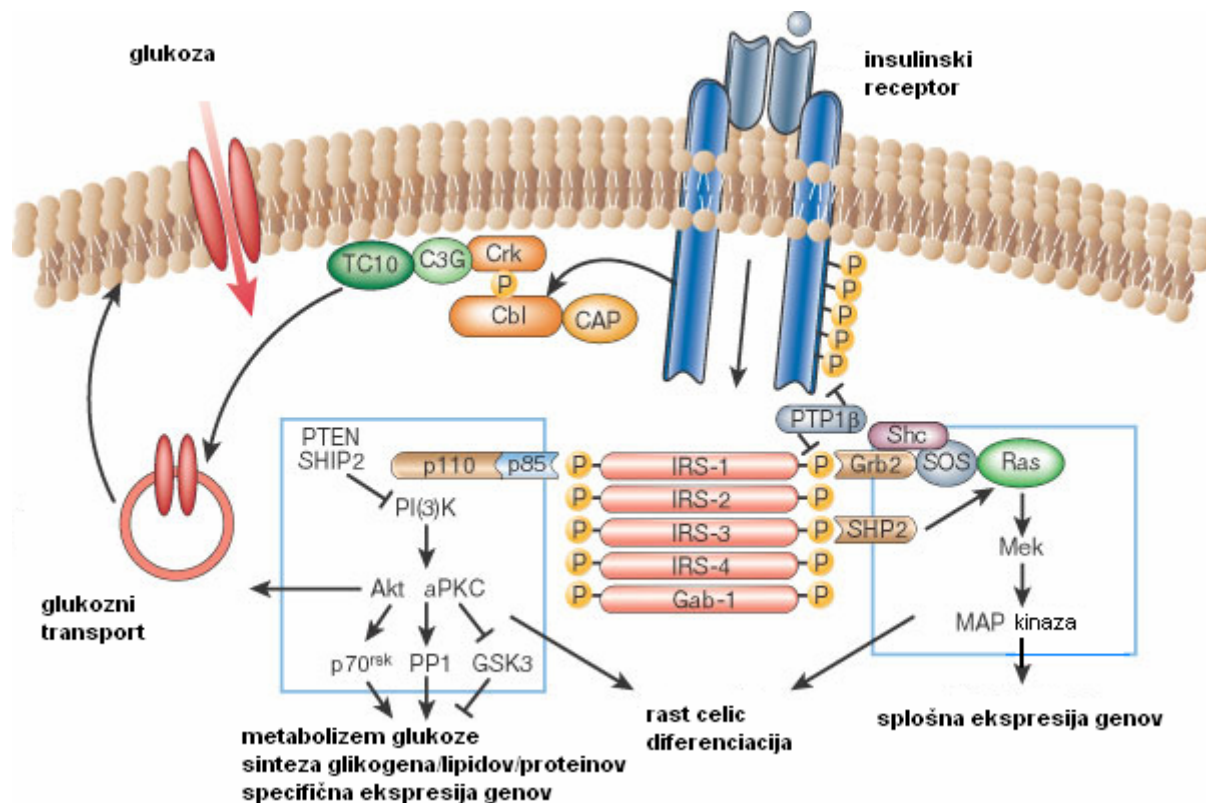
1.1 Inzulin in prenos signala

Inzulin je peptidni hormon, ki se izloča iz β -celic Langerhansovih otočkov trebušne slinavke. Preko povečanega privzema glukoze v mišice in maščevje ter inhibicije nastajanja glukoze v jetrih inzulin deluje kot primarni regulator koncentracije glukoze v krvi. Ima tudi mitogeno delovanje, saj stimulira delitev, rast in diferenciacijo celic. Inzulin kot močan anabolični hormon omogoča sintezo in shranjevanje ogljikovih hidratov, lipidov in proteinov, medtem ko je njihova razgradnja in sproščanje v cirkulacijo zavrti (1, 2).

Inzulinski receptor je heterotetramer, sestavljen iz dveh α in dveh β glikoproteinskih podenot, ki so povezane z disulfidnimi vezmi. Inzulin se veže na izvencelično α -podenoto, kar izzove konformacijsko spremembo, ki omogoči vezavo ATP na znotrajcelični del β -podenote. To sproži avtofosforilacijo tirozinskih ostankov na β -podenoti. Sledi vezava različnih tarčnih proteinov, med drugim proteinov IRS (inzulinski receptorski substrati), ki jih aktiviran inzulinski receptor fosforilira na tirozinskih ostankih (Slika 1). To sproži aktivacijo različnih signalnih poti (1, 3):

- Fosforilacija proteina Shc stimulira od mitogena aktivirano protein kinazno (MAP-kinazno) kaskado, ki regulira ekspresijo genov, ki sodelujejo pri rasti in diferenciaciji celic.
- Tudi fosforilacija Gab-1 aktivira MAP-kinazno kaskado.
- Fosforilacija proteinov IRS preko fosfatidil-inozitol-3-kinaze (PI3K) aktivira fosfoinozitudno kaskado, kar vodi v stimulacijo različnih presnovnih procesov, med drugim sinteze glikogena in translokacije glukoznega transporterja GLUT 4 na celično površino. Prav tako je stimulirana celična rast in diferenciacija.
- Fosforilacija kompleksa APS/Cbl vodi v stimulacijo proteina TC 10 in v od PI3K neodvisno regulacijo glukoznega transporta (3).

Kompleks inzulin-receptor z endocitozo preide v notranjost celice, v endosomu se nato inzulin razgradi, receptor pa se defosforilira in vrne nazaj na membrano celice (1). Presnovne učinke inzulina prikazuje Preglednica I.



Slika 1: Inzulinsko signaliziranje. Prirejeno po (4).

Preglednica I: Presnovni učinki inzulina.

STIMULUSI ZA IZLOČANJE INZULINA	POMEMBNI MEHANIZMI
↑konc. glukoze ↑konc. AK ↑tonus vagusa ↑konc. hormonov GIT	<i>jetra</i> inh. jetrne fosforilaze, ↓ množine in akt. piruvatne karboksilaze, fosfoenolpiruvatne karboksikinaze, fruktoza 1-6-di-fosfataze, glukoza-6-fosfataze, ↑ akt. acetil-CoA karboksilaze, inh. karnitin-palmitoil transferaznega sistema, ↑ akt. glukokinaze in glikogenske sintetaze <i>maščevje</i> ↑ akt. lipoproteinske lipaze, ↓ akt. hormonsko senzitivne lipaze, ↑ vstop glukoze v adipocit (preko uravnavanja translokacije GLUT 4) <i>skeletno mišično vlakno</i> ↑ vstop glukoze preko uravnavanja translokacije GLUT 4 in ↑ glikogenskih rezerv, ↑ vstop AK in ↑ sinteza proteinov
POMEMBNI UČINKI	
<u>antikatabolični:</u> ↓ lipoliza (ma, j) ↓ glikogenoliza (j, mi) ↓ glukoneogeneza (j) ↓ ketogeneza (j) ↓ razgr. beljakovin (mi)	
<u>anabolični:</u> ↑ glikogeneza (j, mi) ↑ sinteza PMK (ma, j) ↑ sinteza glicerola (ma)	

j, jetra; mi, skeletno mišičje; ma, maščevje; ↑ akt., zvečana aktivnost; inh., inhibicija; AK, aminokislina; PMK, proste maščobne kisline; GIT, gastrointestinalni trakt (5)

1.2 Inzulinska rezistenca

Inzulinska rezistenca (IR) je pogosto patološko stanje, kjer se tarčne celice ne odzivajo na običajen nivo cirkulirajočega inzulina. Posledično inzulin ni zmožen vzdrževati normalne homeostaze glukoze in lipidov. Tako so za vzdrževanje normoglikemije potrebne povišane koncentracije inzulina. Kompenzatorna hiperinzulinemija zaradi povečane sekrecije β-celic je zato obvezna spremljevalka IR. Glavne značilnosti IR so neinhibirana lipoliza v maščevju, slabši privzem glukoze v mišice in neinhibirana glukoneogeneza. Klinični znaki IR pa so visceralna debelost, pigmentirana polja na koži (acantosis nigricans), akne, hirsutizem in hepatična steatoza. IR je povezana s številnimi bolezenskimi stanji, med drugim z debelostjo, metaboličnim sindromom, diabetesom tipa 2, lipodistrofijami, sindromom policističnih jajčnikov in kroničnimi infekcijami. Razširjenost IR se giblje med 10 in 25% (6).

Referenčna metoda za merjenje IR je evglikemična hiperinzulinemična sponka. Ta metoda se lahko uporablja za ocenitev hitrosti razporeditve glukoze po telesu med stacionarnim stanjem hiperinzulinemije. Preiskava traja najmanj 2 uri; skozi periferno veno pacient prejema konstantno infuzijo inzulina in variabilno infuzijo glukoze, ki je prirejena preiskovancu, tako da se vzdržuje konstantna koncentracija glukoze v plazmi. Vsakih 5 minut se v odvzeti krvi določa koncentracijo glukoze. Potrebno je tudi preverjati plazemski nivo inzulina. Ta metoda ni primerna za obsežnejše študije (7).

Koncentracija inzulina v plazmi na tešče lahko sama po sebi služi kot indeks občutljivosti tkiv na inzulin. Ob večji stopnji IR je višja tudi koncentracija inzulina na tešče. Ta indeks pa ni uporaben za stanja, kjer je izločanje inzulina zmanjšano kot npr. pri diabetesu tipa 2 (7).

Predlagano je bilo, da bi produkt koncentracije glukoze in inzulina v plazmi na tešče lahko bil bolj točen indeks občutljivosti na inzulin v širokem območju glukozne tolerance (7). Homeostatic model assessment (HOMA) je metoda za določanje funkcije β-celic in IR na podlagi koncentracije glukoze in inzulina ali C-peptida na tešče.

Enačba 1: izračun HOMA indeksa

$$HOMA = \frac{\textit{inzulin} [\text{mU/L}] * \textit{glukoza} [\text{mmol/L}]}{22,5}$$

HOMA-model dobro korelira z evglikemično hiperinzulinemično sponko. Njegova prednost je v tem, da je za določitev potreben le en odvzem krvi. HOMA indeks se danes uporablja v obsežnih epidemioloških in kliničnih študijah (8). Povezava med indeksom HOMA in inzulinsko rezistenco ni linearna, ampak je za njuno povezavo potrebna logaritemska transformacija (7).

Novejša metoda za ugotavljanje inzulinske rezistence je indeks QUICKI (quantitative insulin sensitivity check index) (7).

Enačba 2: izračun indeksa QUICKI

$$QUICKI = \frac{1}{\log \text{inzulin (mU/L)} + \log \text{glukoza (mg/dL)}}$$

Med vzroke za nastanek IR prištevamo tako genetske dejavnike kot tudi dejavnike okolja: povečan vnos hrane, zmanjšana fizična aktivnost, staranje, kajenje in uporaba nekaterih zdravil (tiazidni diuretiki, beta-adrenergični antagonisti, glukokortikoidi). Najpomembnejši dejavnik pri nastanku IR pa je debelost (6).

1.2.1 Mehanizmi nastanka inzulinske rezistence

Proste maščobne kisline in dejavnik tumorske nekroze α :

Maščobno tkivo sprošča velike količine dejavnika tumorske nekroze α (TNF- α), ki je vsaj delno odgovoren za razvoj IR pri debelih osebah. Po drugi strani pa je dobro znano, da znižanje telesne teže poveča občutljivost na inzulin. To naj bi bilo delno posredovano z zmanjšanim sproščanjem TNF- α iz maščobnega tkiva. TNF- α je glavni avtokrini/parakrini faktor, ki sproži izločanje prostih maščobnih kislin (PMK) iz maščobnega tkiva v krvni obtok (9, 10). Visceralno maščobno tkivo izloča PMK direktno v portalni krvni obtok in na ta način močneje učinkuje na jetra kot subkutano maščobno tkivo, ki sprošča svoje produkte v periferni obtok (11).

V jetrih velike količine PMK vstopajo v sintezo trigliceridov, VLDL in v glukoneogenezo. TNF- α zavira gene za privzem glukoze in β -oksidacijo (12).

V mišicah visoke koncentracije PMK stimulirajo β -oksidacijo, kar zmanjša privzem in oksidacijo glukoze (13). Vendar β -oksidacija ne more učinkovito odstraniti PMK iz krvnega obtoka, še posebej v odsotnosti fizične aktivnosti (14). Sinteza glikogena v mišicah je zavrt. Mišice so glavni porabnik glukoze in zmanjšan privzem zelo prispeva k hiperglikemiji (9, 15).

Lipidi, sproščeni iz maščobnih celic kot PMK, se prenašajo v obliki trigliceridov s pomočjo VLDL in kot presežek nalagajo v nemaščobnih tkivih, predvsem v jetrih in mišicah (16, 6).

TNF- α tudi zavre izražanje genov za adiponektin, GLUT 4, IRS-1, C/EBP- α , PPAR- γ in perilipin 1 v maščobnih celicah (17, 12). Poleg tega TNF- α stimulira mnoge gene, ki se izražajo v

maščobnem tkivu in so odgovorni za vnetje, imunski odziv in energijsko ravnotežje, med drugim so to interleukin-6, rezistin in leptin (12).

Adiponektin:

Plazemska koncentracija adiponektina je močno zmanjšana pri IR in vnetnih stanjih (18, 19). Adiponektin se izloča izključno iz adipocitov (18). Občutljivost tkiv na inzulin izboljša preko različnih mehanizmov. V jetrih sproži oksidacijo PMK, zmanjša sintezo lipidov in privzem PMK ter zavre glukoneogenezo (20, 21, 22). V mišicah adiponektin stimulira oksidacijo glukoze in PMK. Ti učinki so delno posledica aktivacije AMP-kinaze (18). Na ta način adiponektin zmanjša koncentracijo PMK in glukoze v plazmi (20, 21).

Sinteza adiponektina je slabša v stanjih presežka kalorij, kar je lahko povezano z leptinsko rezistenco ali pomanjkanjem leptina (21).

Leptin:

Leptin je pomemben pri zagotavljanju normalne občutljivosti tkiv na inzulin (23, 24). Gre za hormon, ki se izloča predvsem iz maščobnega tkiva in deluje kot signal o zadostni količini energije. Leptin zmanjša vnos hrane in poveča potrošnjo energije ter na ta način posredno izboljša občutljivost na inzulin (25). Deluje na hipotalamus in tudi direktno na tarčna tkiva, ki so: mišice, gonade, β -celice in jetra (26). IR in abdominalna debelost sta povezani z nizko koncentracijo topnega leptinskega receptorja in nizkim razmerjem vezan-prost leptin (21).

Rezistin:

Rezistin se v večji meri izloča iz visceralnega kot subkutanega maščobnega tkiva (20). Samo nekateri eksperimenti na glodalcih so potrdili rezistin kot faktor, ki prispeva k IR (27). Človeški rezistin je homologen glodalskemu le v 64% (28). Vedno več je dokazov, da ekspresija rezistina v maščobnem tkivu in njegova koncentracija v plazmi nista povezani z IR ali debelostjo pri ljudeh (21, 29). Funkcija rezistina pri ljudeh še ni znana (6).

Interleukin(IL)-6:

Plazemska koncentracija adipokina IL-6 in njegova ekspresija v maščobnem tkivu sta v dobri povezavi z IR in debelostjo. IL-6 vpliva na inzulinsko signaliziranje (30), poleg tega zavre adipogenezo in izločanje adiponektina (20).

Okvare v inzulinskem signaliziranju:

V genu za inzulinski receptor je identificiranih več kot 60 mutacij. Vpliv teh mutacij je različen: med drugim lahko pride do zmanjšane tirozinske fosforilacije β -podenote po vezavi inzulina ali pa do slabše vezave inzulina na receptor (6).

Zmanjšana aktivnost inzulinskega receptorja bi lahko bila posledica Ser/Thr fosforilacije receptorja, zmanjšano število receptorjev na celični površini pa posledica povečane razgradnje receptorja (31).

Kar se tiče okvar v postreceptorskem signaliziranju, je bistveni dejavnik, ki prispeva k IR, povečana Ser/Thr fosforilacija IRS-1. Ta je lahko posledica povečane koncentracije TNF- α in hiperinzulinemije. Ser/Thr fosforilaciji sledi povečana razgradnja IRS-1 v proteosomih, kar zmanjša koncentracijo IRS-1 (6).

TNF- α , IL-6 in inzulin inducirajo pomembno skupino dejavnikov IR—proteine SOCS (suppressors of cytokine signalling). Ti proteini imajo vsaj tri različne mehanizme delovanja: tekmujejo z IRS-1 za povezavo z inzulinskim receptorjem, zavrejo Janus-kinazo, ki sodeluje pri inzulinskem signaliziranju, in povečajo razgradnjo IRS-1 po proteosomski poti (32).

Visoke koncentracije PMK v plazmi preko transformacije do diacilglicerola, ki je močan aktivator protein kinaze C (PKC), povečajo serinsko fosforilacijo na IRS-1. Poleg tega povečana koncentracija PMK tudi zmanjša aktivnost IRS-1/2 in PI3K, kar povzroči IR (31).

1.3 Sindrom policističnih jajčnikov

Sindrom policističnih jajčnikov (PCOS) je pogosta endokrina motnja, ki prizadene od 4% do 12% žensk v rodnem obdobju. Čeprav gre za heterogeno skupino bolezni, sta glavni značilnosti PCOS hiperandrogenizem in kronična anovulacija. Sindrom sta prvič opisala Stein in Leventhal v letu 1935 (33). Danes pa vemo, da PCOS ne prizadene zgolj reproduktivnega sistema, ampak je to metabolični sindrom, ki lahko vključuje IR, hiperinzulinemijo, hiperlipidemijo, debelost in pomeni zvečano tveganje za razvoj zmanjšane glukoze tolerance, diabetesa tipa 2, hipertenzije in srčno-žilnih bolezni. PCOS se lahko pojavi v katerikoli dobi življenja; od otroštva (prezgodnja puberteta), adolescence (poraščenost, menstrualne nepravilnosti), zgodnjega odraslega obdobja in srednjih let (neplodnost, glukoza intoleranca) do poznejših let (diabetes tipa 2 in srčno-žilna obolenja) (34,35).

Klinični znaki PCOS zajemajo:

- kronično anovulacijo, ki se pogosto kaže kot oligomenoreja, amenoreja, disfunkcionalne krvavitve v maternici in/ali neplodnost. Približno 20% bolnic s PCOS pa ima normalne menstruacijske cikle. Pogosto se menstrualne nepravilnosti začnejo že z menarho, čeprav se lahko pojavijo tudi šele kasneje v življenju, na primer po občutnem povečanju telesne teže. Pri bolnicah s PCOS je pogostejši tudi spontani splav v prvem trimesečju nosečnosti.
- hiperandrogenizem, ki se klinično kaže kot hirsutizem, akne in/ali moški tip alopecije. Povišane so serumske koncentracije androgenov: testosterona, androstendiona in dehidroepiandrosteron-sulfata (DHEAS) iz jajčnikov. Večina bolnic s PCOS ima tudi znižano koncentracijo vezalnega globulina za spolne hormone (SHBG) v serumu.

- abdominalno debelost, ki sicer ni potrebna za diagnosticiranje PCOS, saj se pojavlja le pri 35 do 50% teh bolnic;
- pigmentirana polja na koži, imenovana acanthosis nigricans (33).

Povečana tveganja za metabolične in srčno-žilne zaplete so močno povezana z IR (35). Razširjenost IR med bolnicami s PCOS je od 50 do 70% (36), medtem ko se pri zdravih giblje med 10 in 25% (6).

Ženske s PCOS izkazujejo mnoge nepravilnosti v lipidnem in lipoproteinskem profilu; imajo povečane vrednosti holesterola, trigliceridov, LDL-holesterola in znižane vrednosti HDL-holesterola in apolipoproteina A-I v krvi. Hiperandrogenizem verjetno ima neko vlogo pri teh nepravilnostih, vendar je vpliv IR pomembnejši. Najbolj značilna sprememba v lipidnem profilu pri PCOS je znižan nivo HDL-holesterola (35), kar pomeni veliko tveganje za razvoj koronarne srčne bolezni pri ženskah (37).

Bolnice s PCOS imajo štirikrat večje tveganje za rak endometrija in sicer že v tretjem desetletju življenja. Zaradi anovulacije, kontinuiranega izločanja estrogenov in pomanjkanja učinkov progesterona prihaja namreč do nenadzorovane tvorbe materničnega epitelija (38).

PCOS je izrazit primer sindroma, pri katerem lahko z zgodnjim odkritjem in ukrepanjem v smislu nadzora telesne teže, ustrezne prehrane in fizične aktivnosti preprečimo ali odložimo razvoj diabetesa tipa 2 in ateroskleroze, ki vodi v koronarno srčno bolezen (39).

Organizaciji National institute of child health and human development in National institutes of health (NICHD/NIH) sta leta 1990 sprejeli kriterije, ki so potrebni za diagnosticiranje PCOS; potrebna je prisotnost obeh znakov:

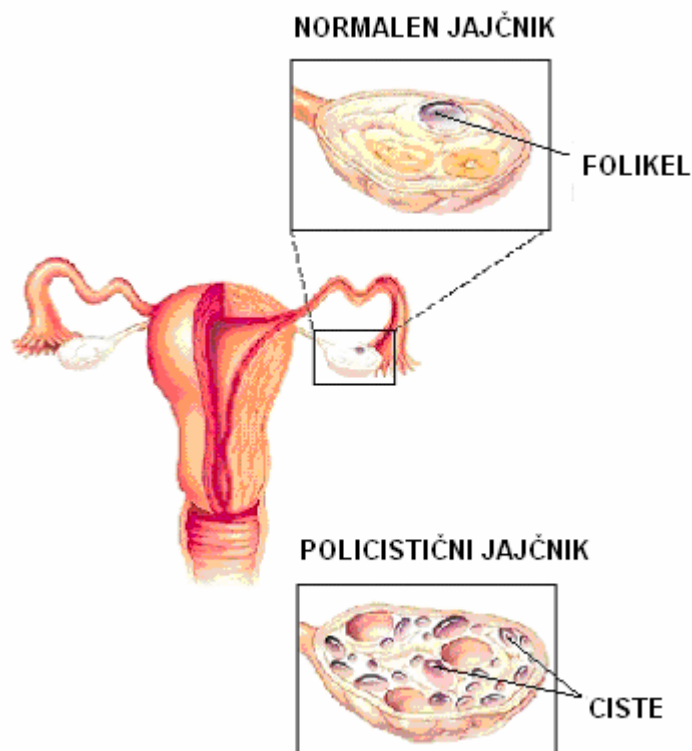
- znaki kliničnega ali biokemičnega hiperandrogenizma in
- oligoovulacija (40).

Leta 2003 so bili sprejeti Rotterdamski kriteriji (ESHRE/ASRM), ki diagnosticirajo PCOS ob potrjeni prisotnosti vsaj 2 od skupno 3 kriterijev:

- oligoovulacija ali anovulacija,
- klinični in/ali biokemični znaki hiperandrogenizma in
- policistični jajčniki, dokazani z ginekološko ultrasonografijo (41).

Pri obeh skupinah diagnostičnih kriterijev moramo za potrditev diagnoze izključiti druge etiologije: kongenitalno adrenalno hiperplazijo, tumorje jajčnikov ali nadledvične žleze, ki izločajo androgene, hiperprolaktinemijo in Cushingov sindrom (42).

Posebej sporen kriterij je prisotnost policističnih jajčnikov (Slika 2) pri ultrazvočnem pregledu. Za policistične jajčnike so značilne periferne ciste (10 ali več) velikosti manj kot 10 mm. Jajčnik je povečan na račun centralne strome. Ta diagnostični kazalec naj bi bil subjektiven in nespecifičen, saj policistične jajčnike najdemo tudi pri ženskah brez menstrualnih motenj ali hiperandrogenizma. Lahko so posledica nepopolnega razvoja jajčnega folikla ali druge motnje v ovulaciji. Pojavijo se lahko v zgodnjem obdobju adolescence, pri ženskah z bulimijo, anoreksijo nervoso in v stanjih povečanega adrenalnega nastajanja androgenov ter hiperprolaktinemije (34).



Slika 2: Primerjava normalnih in policističnih jajčnikov. Prirejeno po (43).

1.3.1 Patofiziologija PCOS

IR in spremljajoča hiperinzulinemija imata po nekaterih hipotezah ključno vlogo pri razvoju PCOS. Te hipoteze so podprte z dejstvom, da izguba telesne teže in zdravila, ki povečajo občutljivost tkiv na inzulin, zmanjšajo hiperandrogenemijo in povrnejo ovulacijo (36). Poleg tega koncentracija inzulina na tešče dobro korelira s koncentracijo androgenov v plazmi (44).

Steroidogeneza v jajčniku je v osnovi odvisna od luteinizirajočega hormona (LH), čeprav nekatere študije navajajo tudi močan sinergistični učinek inzulina na steroidogenezo, ne glede na periferno IR (36). V stanju hiperinzulinemije je glavna značilnost v jajčniku funkcionalni hiperandrogenizem (Slika 3). Teka celice jajčnika se na povečane koncentracije inzulina in LH v krvnem obtoku odzovejo s povečano proizvodnjo androgenov (34). Ker so bili inzulinski receptorji najdeni tudi v hipofizi (45), lahko sklepamo, da so povečane koncentracije LH v plazmi

posledica hiperinzulinemije. Povečane koncentracije inzulina v plazmi tudi zavrejo sintezo SHBG v jetrih in tako povečajo biorazpoložljivost androgenov (46).

Povečana biosinteza androgenov naj bi pri bolnicah s PCOS zavrla ovulacijo. Zaradi kopičenja androgenov v foliklih jajčnika pride do zmanjšane aktivnosti aromataze v celicah granuloze teh foliklov. Nastajanje estradiola iz androstendiona je tako zmanjšano, zaradi česar je zavrto sproščanje folikle-stimulirajočega hormona (FSH) in s tem tudi ovulacija (36).

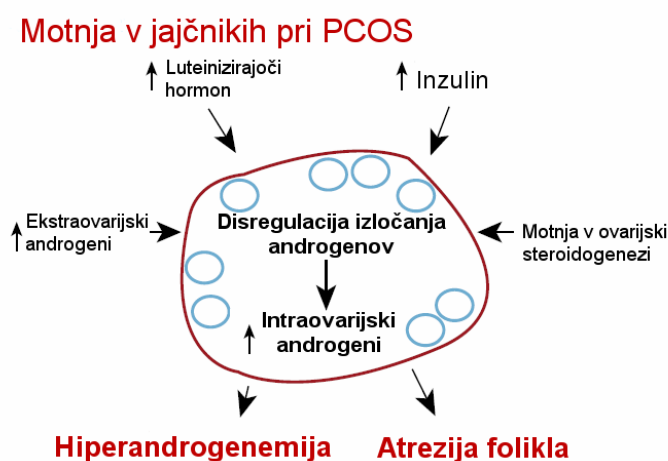
Okvare v inzulinskem signaliziranju pri bolnicah s PCOS in IR so tkivno specifične; PI3K aktivnost povezana z IRS-1 je zmanjšana v mišičnih celicah (47), vendar normalna v fibroblastih (48).

Obstaja selektivna okvara v delovanju inzulina v PCOS fibroblastih, ki prizadene le metabolne in ne mitogenih signalnih poti (48). Dokazano je bilo, da inzulini stimulira steroidogenezo v celicah teke pri bolnicah s PCOS preko vezave na lastne receptorje, kar je bilo potrjeno tudi v celicah teke pri zdravih. Po aktivaciji inzulinskega receptorja transdukcija signala poteka preko inozitolglikanskih mediatorjev. Domnevajo, da se signalna pot distalno od PI3K razcepi na dve poti; ena regulira glukozni transport, druga pa biosintezo androgenov (49, 47). Pri bolnicah s PCOS in IR je prva pot okvarjena, medtem ko druga poteka z večjo aktivnostjo (6).

Predpostavljeni mehanizem, ki bi lahko bil odgovoren za povečano biosintezo androgenov, je tudi pretirano povečana serinska fosforilacija P450c17 (ključni encim v ovarijski biosintezi androgenov), s čimer se poveča njegova aktivnost (50). Povečana serinska fosforilacija inzulinskega receptorja in IRS-1 je tudi mehanizem, ki prispeva k IR.

Obstaja veliko žensk z IR, ki ne razvijejo PCOS (51), po drugi strani pa je študija sester bolnic s PCOS pokazala, da se pri isti genetski osnovi znaki bolezni razvijejo predvsem pri tistih sestrah, ki so debele (52). Možna je torej prisotnost intrinzične okvare v jajčniku, ki je morda genetskega izvora, vendar je potrebna še IR, da sproži razvoj PCOS (51).

Druge hipoteze, ki izključujejo vpliv IR, pravijo, da je vzrok za razvoj PCOS motnja v jajčniku, ki vodi v moteno regulacijo v osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza (53).



Slika 3: Motnja v jajčniku pri PCOS.

Prilagojeno po (34).

1.4 Lipin 1

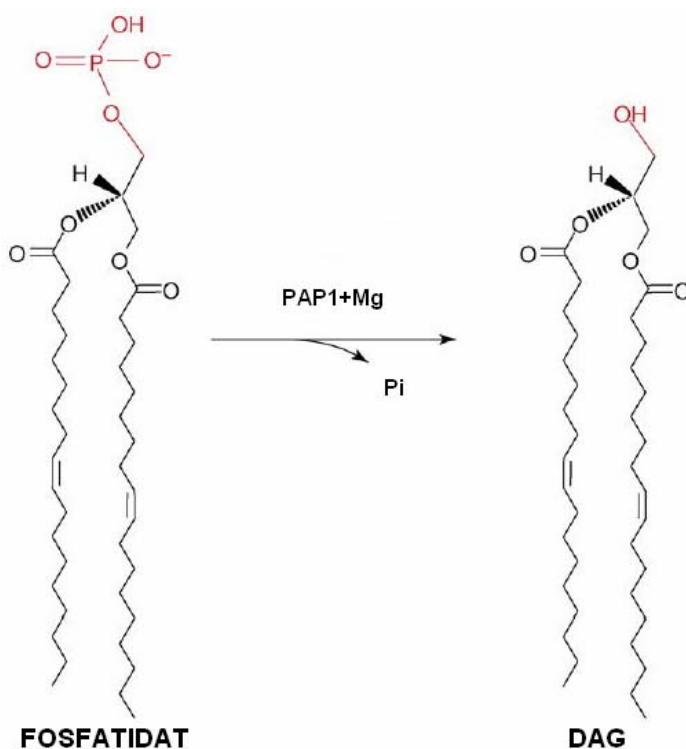
Lipin 1 je multi-funkcionalen 891 aminokislin (AK) dolg protein, ki regulira metabolizem lipidov na različnih nivojih (54, 55). V večjih količinah se izraža v presnovno aktivnih tkivih, kot je belo in rjavo adipozno tkivo in skeletno mišičje. Lipin 1 se v manjših količinah izraža tudi v drugih tkivih, ki so pomembna za homeostazo lipidov in glukoze. Med drugim so to jetra in β -celice pankreasa (56).

1.4.1 Lipin 1 kot encim

Lipin 1 je od Mg^{2+} odvisna fosfataza fosfatidne kisline (phosphatidic acid phosphatase, PAP1) (57). Aktivnost PAP1 je primarno lokalizirana v citosolu, kjer za kratek čas interagira s citosolno površino endoplazmatskega retikuluma, ki je glavno mesto za sintezo glicerolipidov (58). Fosfatidna kislina oziroma fosfatidat, ki nastane iz glicerol-fosfata in lizofosfatidata, je predstopnja v sintezi trigliceridov in ima pomembno vlogo pri membranskih fuzijskih dogodkih, prav tako pa se vključuje v nadzor subcelične distribucije mnogih proteinov (57, 58).

Lipin 1 katalizira defosforilacijo fosfatidata, pri čemer nastane diacilglicerol (DAG) in anorganski fosfat (Slika 4) (59). DAG vstopa v sintezo triacilglicerola (TAG), fosfolipidov, fosfatidilserina, fosfatidilholina in fosfatidiletanolamina (57).

Odkrita sta bila tudi dva nova proteina, ki spadata v družino lipinov, lipin 2 in lipin 3. Oba imata encimsko aktivnost PAP1, vendar različen vzorec ekspresije v sesalskih tkivih v primerjavi z lipinom 1 (58).



Slika 4: Defosforilacija fosfatidata. Prirejeno po (59).

1.4.2 Lipin 1 in lipodistrofija

Gen *LPIN1*, ki kodira lipin 1, je bil identificiran s pozicijskim kloniranjem kot gen, ki je mutiran pri miših z lipodistrofijo in zamaščenimi jetri (fatty liver dystrophy, fld) (55). Mutacija v genu za lipin 1 pri teh živalih povzroči lipodistrofijo. Njene značilnosti so hudo pomanjkanje adipoznega tkiva, razvoj inzulinske rezistence in napredujoča periferna nevropatija (60). Miši *fld* so model, ki ima značilnosti humane lipodistrofije. To je genetsko heterogena skupina motenj, pri kateri se poleg že naštetega pojavijo še hipertrigliceridemija, hipertenzija, diabetes in ateroskleroza (55, 61).

1.4.3 Vloga lipina 1 v adipogenezi

S študijami na miših *fld* so raziskovalci ugotovili, da je izguba adipoznega tkiva pri teh živalih direktna posledica slabše diferenciacije adipocitov zaradi pomanjkanja lipina 1. Ta protein je potreben v začetnih stopnjah adipogeneze za indukcijo ključnih adipogenih genov, med drugim PPAR γ in C/EBP α . Tako pomanjkanje lipina 1 prepreči zorenje adipocitov *in vitro* in povzroči lipodistrofijo *in vivo* (62).

Lipin 1 ima dvofazni vzorec ekspresije v adipocitih z dvema vrhoma ekspresije med adipogenezo – blaga indukcija v preadipocitih pred ekspresijo transkripcijskih faktorjev PPAR γ in C/EBP α ter drugi val ekspresije v zrelih adipocitih. Prvi val ekspresije lipina 1 v deseti uri diferenciacije sovпада s podobnim vrhom v ekspresiji dveh transkripcijskih faktorjev C/EBP β in C/EBP δ . Obstaja torej možnost, da je ekspresija lipina 1 inducirana s podobnimi faktorji ali celo ko-regulirana s C/EBP β in $-\delta$. Po drugi strani pa preliminarni eksperimenti nakazujejo možnost, da je v ekspresijo lipina 1 vpleten mehanizem, ki je neodvisen od indukcije C/EBP β in $-\delta$ ali pa potrebuje ta dva faktorja (63).

Lipin 1 ima kritično vlogo v diferenciaciji preadipocitov kot tudi pri delovanju zrelih adipocitov, kjer pomembno sodeluje v lipogenezi. Ekspresija lipina 1 v zrelih adipocitih vpliva na učinkovitost shranjevanja lipidov (63, 64).

Homolog lipina 1 v kvasovkah naj bi imel vlogo v nukleocitoplazemskem transportu in/ali funkciji jedrne ovojnice. To je skladno z njegovo jedrno lokalizacijo v sesalski celici (60). Imunoprecipitacijska analiza kromatina je pokazala, da je homolog lipina 1 v kvasovkah (SMP2) povezan s promotorskimi regijami določenih genov, vendar nima domen, ki so potrebne za direktno interakcijo z DNA (54). Tako lahko zaključimo, da ima lipin 1 pri izražanju genov vlogo transkripcijskega regulatorja (58).

1.4.4 Vloga lipina 1 v jetrih

V jetrih je lipin 1 tarča transkripcijskega koaktivatorja PGC-1 α (koaktivator PPAR γ 1 α). Ekspresijo lipina 1 v tem organu spodbujajo stradanje, glukokortikoidi in diabetes preko delovanja PGC-1 α . Stradanje in diabetes povečata dotok PMK v jetra. Lipin 1 aktivira ekspresijo mnogih genov, ki so vpleteni v mitohondrijski oksidativni metabolizem PMK, preko transkripcijske aktivacije gena za PPAR α in preko direktne interakcije s kompleksom PPAR α /PGC-1 α . Poleg tega se pod vplivom lipina 1 tudi zavre lipogeneza in sekrecija trigliceridov v jetrih. Lipin 1 je tako selektivni fiziološki ojačevalec delovanja kompleksa PGC-1 α /PPAR α na jetrni lipidni metabolizem (54).

1.4.5 Regulacija lipina 1 preko inzulina

Pri od inzulina stimulirani fosforilaciji v adipocitih ima osrednjo vlogo aktivacija PI3K, ki posreduje tudi večino pomembnih metabolnih učinkov inzulina (64). Ta hormon poveča sintezo in blokira razgradnjo proteinov preko aktivacije proteina mTOR (mammalian target of rapamycin) (2). mTOR spada v družino Ser/Thr proteinskih kinaz, ki imajo katalitične domene, homologne s PI3K. Inzulin, določeni rastni faktorji in serum lahko povečajo kinazno aktivnost mTOR (64). Za polno aktivacijo te signalne poti z rastnimi faktorji naj bi bila potrebna prisotnost AK v mediju (2). Na ta način se vzdržuje ustrezno ravnotežje med količino AK, ki so na voljo, in sintezo proteinov ter celično rastjo (64).

Inzulin je odgovoren za fosforilacijo lipina 1, ki jo nadzoruje signalna pot mTOR. Ob inkubaciji podganjih adipocitov z inzulinom pride do stimulacije fosforilacije tako serinskih kot treoninskih ostankov v lipinu 1. Ta protein tako predstavlja tarčo signalne poti mTOR in potencialno povezuje to od hranil občutljivo pot z razvojem adipocitov (64).

Fosforilacija lipina 1 je odvisna tudi od aktivnosti PI3K, vendar ni jasno, ali mTOR deluje v okviru poti PI3K ali pa gre za paralelno signalno pot (64). Druga študija navaja, da je signalna pot mTOR locirana distalno od IRS-1/2 in PI3K v signalni kaskadi, regulirala pa naj bi adipocitni glukozni transport (65).

Protein kinaza B (PKB), ki se aktivira v PI3K reakciji, je najresnejši kandidat za fosforilacijo lipina 1 (64). Druge študije navajajo kot dobre kandidate za fosforilacijo tega proteina v adipocitih MAP-kinaze in mTOR (57). V vsakem primeru pa pri fosforilaciji lipina 1 sodeluje več proteinskih kinaz. Lipin 1 vsebuje mnogo potencialnih mest za fosforilacijo. Študija, ki je ta mesta določala z masno spektrometrijo, je prišla do številke 15 (64, 57).

Od inzulina stimulirana fosforilacija lipina 1 se pojavi v adipocitih 3T3-L1. Adrenalin in inzulin imata recipročen učinek na fosforilacijo lipina 1, kar je v skladu z nasprotujočim delovanjem teh dveh hormonov na akumulacijo TAG v adipocitih. Povečana fosforilacija lipina 1 ne spremeni signifikantno njegove intrinzične PAP1-aktivnosti, ampak poveča količino citosolne frakcije na račun frakcije vezane na endoplazmatski retikulum. Adrenalin in oleinska kislina imata obraten učinek. Iz tega sledi ugotovitev, da inzulin in adrenalin nadzorujeta funkcijo lipina 1 primarno s spreminjanjem njegove subcelične lokalizacije in ne intrinzične PAP1-aktivnosti. Rezultati, ki izhajajo iz te študije, podpirajo tako hipotezo, da fosforilacija nadzoruje znotrajcelično lokalizacijo proteina, kot tudi možnost, da se spremembe v fosforilaciji pojavijo za tem, ko se spremeni znotrajcelična lokalizacija (57).

Paradokсно je, da inzulin poveča sintezo TAG, vendar zmanjša količino na membrano vezane fosfataze (lipina 1), ki naj bi bila bolj aktivna oblika v sintezi TAG. Morda imajo spremembe v lokalizaciji lipina 1 vlogo, ki je povezana s funkcijami fosfatidne kisline, ki ne vključujejo sinteze TAG (57).

1.4.6 Transgeni mišji modeli

Z uporabo transgenih mišjih modelov so raziskovalci pokazali, da povečana ekspresija lipina 1 tako v zrelih adipocitih kot v skeletnih mišicah stimulira debelost. To se v teh dveh tkivih zgodi preko različnih mehanizmov:

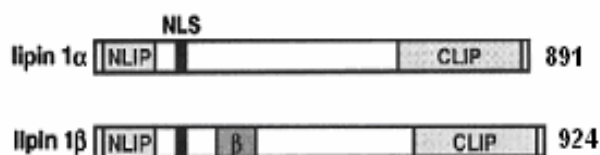
- izražanje gena za lipin 1 v adipoznem tkivu vpliva na kapaciteto adipocitov za shranjevanje lipidov.
- izražanje lipina 1 v skeletnih mišicah določa potrošnjo energije na ravni celega telesa in porabo PMK (60).

Ti dve tkivi različno vplivata na glukozno homeostazo in inzulinsko občutljivost. Povečana ekspresija lipina 1 v mišicah povzroči inzulinsko rezistenco, medtem ko povečana ekspresija lipina 1 v zrelih adipocitih poveča občutljivost na inzulin v primerjavi z divjim tipom miši. Zadnje dejstvo je verjetno posledica redistribucije lipidov iz ektopičnih mest, kot so jetra in skeletne mišice, v adipozno tkivo (60).

Transgene miši s povečano ekspresijo lipina 1 v maščobnem tkivu nimajo spremenjene ekspresije adipogenih genov, kot so PPAR γ ali C/EBP α , ampak imajo signifikantno povečano ekspresijo lipogenih genov in genov, ki vplivajo na akumulacijo trigliceridov v adipoznem tkivu (63).

1.4.7 Izooblike lipina 1

Z alternativnim izrezovanjem iz Lpin1-mRNA nastaneta dve izoobliki lipina 1, lipin 1 α in lipin 1 β (Slika 5). Potencialni kandidat, ki sproži spremembo v izrezovanju intronov, je inzulinsko signaliziranje. Lipin 1 α ima vrh ekspresije v drugem dnevu diferenciacije adipocitov 3T3-L1. Ekspresija lipina 1 β se za kratek čas poveča v deseti uri, čemur sledi padec in nato postopno povečevanje ekspresije med drugim in šestim dnevom diferenciacije. Ti dve izoobliki lipina 1 imata različno, vendar komplementarno funkcijo v adipogenezi. Lipin 1 α je prevladujoč v jedru in potreben za diferenciacijo adipocitov (66). Lipin 1 β , ki v primerjavi z obliko α vsebuje insercijo 33 AK, pa se primarno nahaja v citoplazmi adipocitov 3T3-L1 (64, 66). Njegova vloga je regulacija lipogeneze v zrelih adipocitih, kjer vpliva na indukcijo lipogenih genov (66).



Slika 5: Humana proteina lipin 1 α in lipin 1 β . Alternativno izrezan ekson 7 v transkriptu za lipin 1 β kodira dodatnih 33 AK (β). NLIP (CLIP), NH₂-terminalna (COOH-terminalna) konzervativna domena. Prirejeno po (67).

1.4.8 Debelost, IR in lipin 1

LPIN1 je kandidatni gen za debelost, IR in diabetes melitus tipa 2. Ekspresija lipina 1 β v maščevju je zmanjšana pri debelih in pri ženskah z metabolnim sindromom. Izguba teže pri debelih osebah je povezana s povečanjem ekspresije lipina 1 β v maščevju (65, 67). Ta se precej poveča tudi po zdravljenju zmanjšane glukoze tolerance s tiazolidindioni, ki so ligandi za PPAR γ (68).

Glavna značilnost IR je zmanjšanje od inzulina posredovani privzem glukoze v mišice in maščevje. V skeletnih mišicah do tega pride v glavnem zaradi slabšega prenosa GLUT 4 na membrano, čeprav je ekspresija GLUT 4 normalna. IR v adipocitih pa je povezana z zmanjšano ekspresijo GLUT 4 (65).

Količina lipinske mRNA v maščevju je močno povezana tako z bazalnim kot od inzulina stimuliranim adipocitnim glukoznim transportom kakor tudi s količino mRNA za GLUT 4 (65).

Tudi v jetrih je ekspresija lipina 1 β in PGC-1 α zmanjšana pri inzulinsko rezistentnih debelih ljudeh. To se verjetno zgodi zaradi sprememb v koncentraciji inzulina ali pa zaradi spremenjene občutljivosti na inzulin. Z občutnim zmanjšanjem telesne teže se hepaticna ekspresija lipina 1 β signifikantno poveča (67).

Po drugi strani pa lipin 1 kot PAP1 encim favorizira shranjevanje lipidov v maščevju in tako varuje druga tkiva pred prekomernim kopičenjem lipidov, kar vodi v večjo inzulinsko občutljivost (58, 68).

1.4.9 Gen *LPINI*

Gen za lipin 1 se nahaja na kratki ročici kromosoma 2 na mestu 2p25,1 (NC_000002,10: začetek 11804191, konec 11884986). Obsega 80796 baznih parov, sestavljen je iz 20 eksonov in 19 kodirajočih zaporedij (CDS) (GenBank, september 2007).

1.4.9.1 Polimorfizma *SNP1* in *SNP17*

Raziskovalci, ki so preučevali vlogo gena za lipin 1 v dislipidemijah ali debelosti pri ljudeh, so, da bi ocenili genetske variacije v genu *LPINI*, analizirali sedem polimorfizmov (SNP, single nucleotide polymorphism). *SNP1* v genu *LPINI* je v vzorcu finskih dislipidemičnih družin pokazal povezavo z nivojem inzulina v serumu. Za *SNP17* pa se je pokazala razlika v alelni frekvenci med debelimi ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) in suhimi ($BMI = 20\text{-}25 \text{ kg/m}^2$) finskimi posamezniki (69). Osnovne značilnosti obeh polimorfizmov prikazuje Preglednica II.

Preglednica II: Osnovne značilnosti dveh polimorfizmov v genu za lipin 1.

	NCBI SNP Referenca		Pozicija na kromosomu	Pozicija v genu	Frekvenca*
SNP1	rs11693809	IVS1+3341C>T	11807589	intron 1	0,60/0,40
SNP17	rs2716610	IVS17-228C>T	11876833	intron 17	0,90/0,10

*Alelne frekvence so bile določene v finskih dislipidemičnih družinah.

SNP, polimorfizem enega nukleotida (69, 70, 71, 72, GenBank, september 2007)

2 NAMEN DELA

V uvodu smo pokazali, da lipin 1 omogoča diferenciacijo adipocitov in ima pomembno vlogo pri sintezi TAG v zrelih adipocitih. Zato je *LPINI* kandidatni gen za debelost, IR in sladkorno bolezen tipa 2. Namen naše študije je ugotoviti povezanost polimorfizmov SNP1 (IVS1+3341C>T, rs11693809) in SNP17 (IVS17-228C>T, rs2716610) v genu za lipin 1 z inzulinsko rezistenco pri bolnicah s PCOS.

Raziskava bo obsegala naslednje stopnje:

- Z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času bomo genotipizirali vzorce 371 preiskovank za oba polimorfizma.
- S statistično analizo bomo primerjali pogostost posameznega polimorfizma med bolnicami s PCOS ter zdravimi preiskovankami.
- S statistično analizo bomo ugotavljali povezanost posameznega polimorfizma s kliničnimi in biokemičnimi kazalci debelosti, IR ter PCOS.
- Izračunali bomo stopnjo vezavnega neravnovesja in določili haplotipe za posamezen vzorec.
- S statistično analizo bomo ugotavljali povezanost diplotipov s kliničnimi in biokemičnimi kazalci debelosti, IR ter PCOS.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Opis preiskovank

V preiskavo smo vključili 371 preiskovank; 222 je bilo bolnic s PCOS, 149 preiskovank pa je bilo zdravih. Prvo skupino 136 preiskovank (93 bolnic s PCOS, 43 zdravih) so pregledali na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove v Kliničnem centru. Diagnozo PCOS so ugotavljali na podlagi kriterijev NICHD. Drugo skupino 235 preiskovank (129 bolnic s PCOS, 106 zdravih) pa so obravnavali na Ginekološki kliniki Kliničnega centra. Diagnozo PCOS so jim potrdili na podlagi upoštevanja tako kriterijev NICHD kot Rotterdamskih kriterijev. Za vse zdrave preiskovanke je bila potrjena odsotnost znakov PCOS.

Preiskovankam so izmerili biokemične kazalce IR in PCOS: serumske koncentracije inzulina in glukoze na tešče ter skupnega testosterona (Tsk), androstendiona, dehidroepiandrosteron-sulfata (DHEAS) in SHBG. Prvi skupini 136 preiskovank so izmerili tudi prosti testosteron in lipide (trigliceridi (TAG), celokupni holesterol, HDL-holesterol, LDL-holesterol) v serumu. Vsem preiskovankam so izmerili še višino in telesno težo ter iz tega izračunali indeks telesne mase (BMI). Na Katedri za klinično biokemijo smo na podlagi koncentracije glukoze in inzulina na tešče izračunali indeks HOMA.

3.2 Opis vzorcev DNA in njihovo vrednotenje

Iz levkocitov periferne krvi preiskovank so izolirali genomsko DNA z metodo izsoljevanja po Millerju. V prvi skupini, ki je zajemala 136 vzorcev, so z merjenjem absorbance z UV/VIS spektrofotometrom (Beckman Du[®]530 ali NanoDrop[®] ND-1000) določili koncentracijo DNA v osnovnih raztopinah. Iz teh osnovnih raztopin smo z redčenjem v razmerju 20:1 pripravili delovne raztopine, ki so služile kot vzorčna DNA za gensko analizo. V dveh primerih smo zaradi nizke koncentracije DNA v osnovni raztopini le-te redčili v razmerju 5:1. V prav tako dveh primerih pa smo za analizo uporabili osnovno raztopino DNA.

V drugi skupini, ki je obsegala 235 vzorcev, so najprej iz osnovnih raztopin DNA z redčenjem v razmerju 20:1 ali 4:1 pripravili delovne raztopine, ki so služile za nadaljnjo analizo. Nato smo v delovnih raztopinah z merjenjem absorbance z UV/VIS spektrofotometrom (NanoDrop[®] ND-1000) določili koncentracijo DNA. Nekatere delovne raztopine smo še naknadno redčili na koncentracijo 2 ng/ μ l, saj je bila v njih koncentracija DNA previsoka za analizo s PCR v realnem času.

3.2.1 Določanje koncentracije DNA z UV spektrofotometrično metodo

Organske baze v nukleinskih kislinah imajo absorpcijski maksimum pri 260 nm. Z merjenjem absorbance pri tej valovni dolžini lahko neposredno določimo koncentracijo, vendar le, če vzorec ni onečiščen s proteini, fenoli ipd., ki absorbirajo svetlobo iste valovne dolžine. Pri raztopini čiste dvojnoverižne DNA je razmerje A_{260}/A_{280} enako 1,8. Kontaminacija s proteini ali fenoli ima za posledico nižjo vrednost, prisotnost RNA to vrednost poviša. Prednost spektrofotometrične metode določanja DNA je v njeni nedestruktivnosti (73).

NanoDrop[®] ND-1000 je celotnospektralni (220-750 nm) UV/VIS spektrofotometer, ki omogoča merjenje absorbance DNA, RNA, proteinov in barvil brez uporabe kivet ali kapilar. Sistem retencije vzorca omogoča analizo majhnih volumnov (1 μ l): kapljica vzorca se zadrži na mestu zaradi površinske napetosti, medtem ko jo ročica rahlo stisne in se ustvari stolpec vzorca med obema površinama (Slika 6); pri tem je dolžina poti svetlobnega žarka 1 mm. Meritev, ki traja le 10 sekund, se nato izvede s pomočjo dveh optičnih vlaken, nameščenih v ročici in spodnji merilni površini (74).



Slika 6: Tehnologija NanoDrop (74).

Reagenti in oprema

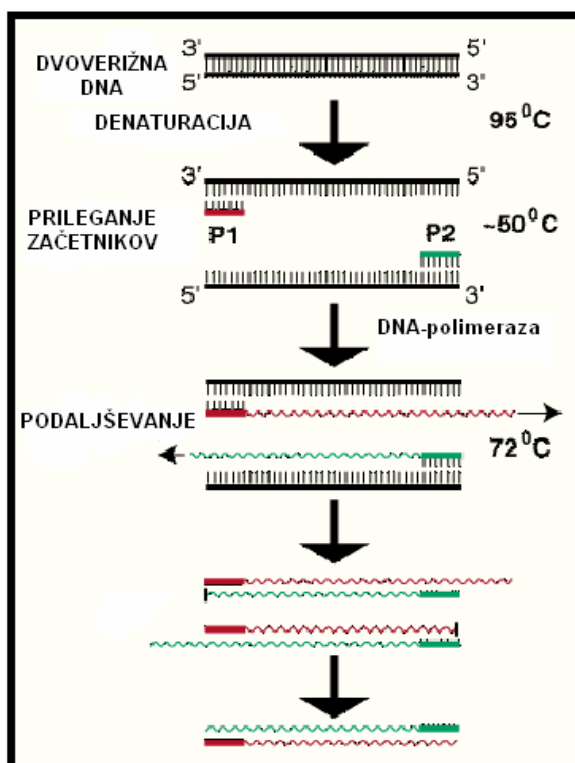
- ◆ delovne raztopine DNA (1,5 μ l)
- ◆ ultračista voda (Elga, Purelab)
- ◆ centrifuga 5804R (Eppendorf)
- ◆ vorteks EV-202 (Tehtnica, Železniki)
- ◆ NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies)
- ◆ avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt)
- ◆ pipeta 0,1-2,5 μ l (Eppendorf)
- ◆ staničevina, rokavice iz lateksa – brez magnezijevega stearata (Kimberly Clark)

3.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Princip

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij želenega odseka DNA. Zaradi tega za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca, kar pomeni bistveno prednost PCR pred klasičnimi tehnikami molekularne biologije, kjer analiziramo nepomnoženo DNA ali RNA in potrebujemo večje količine biološkega materiala.

Reakcijsko zmes za PCR sestavljajo vzorec DNA, ki služi kot matrica, dva oligonukleotidna začetnika, s katerima omejimo odsek, ki ga želimo pomnožiti, deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP), ki predstavljajo gradnike za nove verige DNA, Mg^{2+} ioni, reakcijski pufer in termostabilna DNA-polimeraza. Najpogosteje se uporablja Taq-DNA-polimeraza, ki je izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*. Reakcija poteka ciklično, vsak cikel pa je sestavljen iz treh stopenj: denaturacije, prileganja oligonukleotidnih začetnikov in izgrajevanja komplementarne verige (Slika 7). V stopnji denaturacije s segrevanjem na 94-95 °C razklenemo dvoverižno DNA. Nato znižamo temperaturo na 40-60 °C, pri čemer pride do prileganja oligonukleotidnih začetnikov na enoverižne DNA. Temperaturo dvignemo na 72 °C, ki je optimalna za delovanje termostabilne DNA-polimeraze. Encim se veže na oligonukleotidni začetnik in v smeri 5' proti 3' izgradi komplementarno verigo DNA. Teoretično se z vsakim ciklom število kopij želenega odseka DNA podvoji (75).

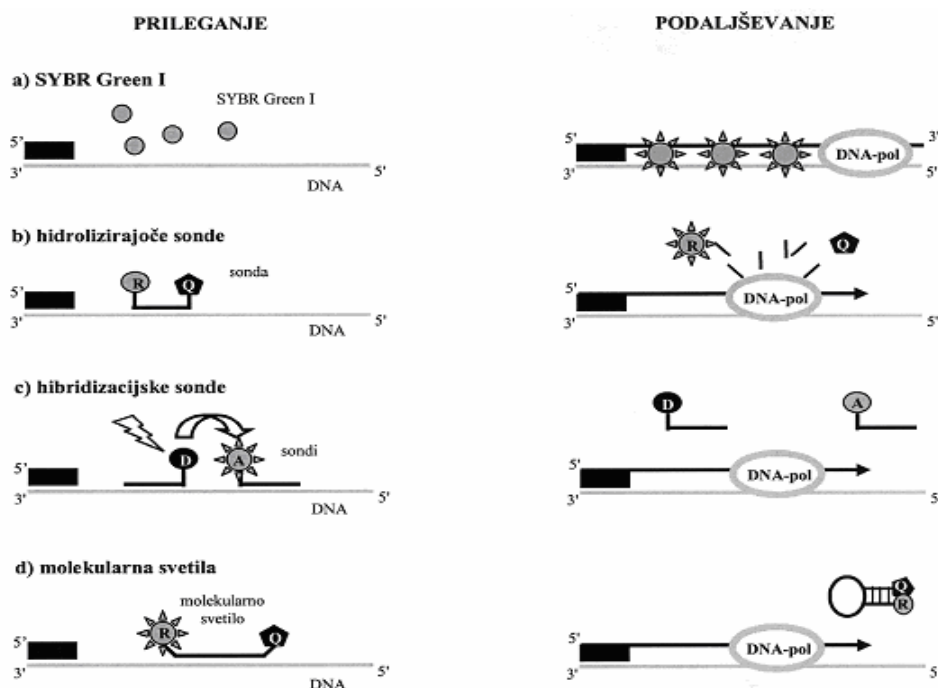


Slika 7: Potek PCR. Prirejeno po (76).

PCR v realnem času predstavlja nadgradnjo konvencionalnega PCR. Sinonim zanj je kinetični PCR, ker omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo, za razliko od konvencionalnega PCR, kjer poteka detekcija produktov po končanem pomnoževanju. Pri PCR v realnem času pomnoževanje in zaznava produktov torej potekata sočasno. Temelji na merjenju fluorescence. Najpomembnejša prednost PCR v realnem času pred konvencionalnim PCR je lažja kvantifikacija nukleinskih kislin. Kontinuirano spremljanje poteka reakcije nam omogoči, da na osnovi izmerjenih podatkov narišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov. Mi smo metodo uporabili za kvalitativno analizo polimorfizmov.

Poznamo nespecifične in specifične načine detekcije produktov s PCR v realnem času. V prvo skupino spadajo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v dvovertično DNA in ob ekscitaciji močno fluorescirajo. Primer je SYBR Green I (Slika 8a), ki je nadomestil etidijev bromid, ki se danes skoraj ne uporablja več.

Med specifične načine detekcije sodijo s fluorofori označene oligonukleotidne sonde, ki se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. Za meritev signala izkoriščamo princip fluorescenčnega resonančnega prenosa energije (FRET) iz donorske na akceptorsko molekulo. Kadar sta dva fluorofora, katerih ekscitacijski in emisijski spekter se prekrivata, dovolj blizu, ekscitacija donorskega barvila povzroči emisijo svetlobe, ki ekscitira akceptorsko barvilo, to pa posledično emitira svetlobo drugačne valovne dolžine. Kot akceptorje lahko uporabimo tudi molekule, ki absorbirajo svetlobo donorske molekule, same pa ne fluorescirajo. Najpogosteje se iz te skupine uporabljajo: hidrolizirajoče in hibridizacijske sonde ter molekularna svetila (Slika 8b, c, d).



Slika 8: Načini detekcije produktov pri PCR v realnem času (75).

V primeru hibridizacijskih sond uporabimo dve sekvenčno specifični sondi, ki sta označeni ena z donorskim, druga pa z akceptorskim fluoroforom. Ker nastane signal samo ob vezavi obeh sond na pravilno tarčno zaporedje, so zelo specifične. Molekularna svetica so sonde, ki imajo na enem koncu vezan reporterski fluorofor, na drugem pa nefluorescentni dušilec (75).

3.3.1 Genotipizacija z metodo alelne diskriminacije

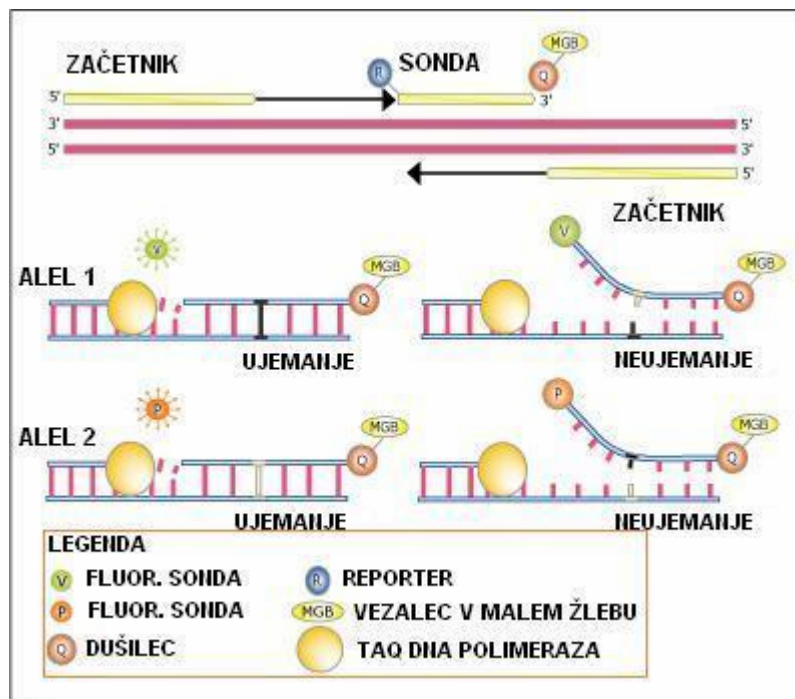
Metoda alelne diskriminacije s sondami TaqMan predstavlja eno izmed možnosti uporabe tehnologije PCR v realnem času. TaqMan je hidrolizirajoča sonda, ki ima na enem koncu vezano fluorescenčno reportersko barvilo, na drugem pa molekulo, ki deluje kot dušilec signala. Le-ta je lahko prav tako fluorescenčno barvilo, lahko pa je kot v našem primeru nefluorescenčna molekula. Pri intaktni sondi torej fluorescenco, ki jo emitira reportersko barvilo, vezano na 5'-koncu, prestreže dušilec, ki je vezan na 3'-koncu. Tekom PCR povzroči 5'-eksonukleazna aktivnost Taq-DNA-polimeraze hidrolizo na tarčno zaporedje vezane sonde v stopnji podaljševanja. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se poveča in tako je onemogočeno prestrezanje fluorescence. Fluorescenca reporterskega barvila zato poraste in je sorazmerna s količino produkta PCR. Ker pride do cepitve sonde le v primeru, ko je ta vezana na DNA, je potrebno prilagoditi temperaturo stopnje podaljševanja. Običajno se stopnji prileganja in podaljševanja združita v eno stopnjo, ki poteka pri 60°C (75).

Za določanje polimorfizmov, ki so posledica točkovnih mutacij, uporabimo par začetnih oligonukleotidov in par oligonukleotidnih sond dolžine 13 do 22 baznih parov, ki se razlikujeta na mestu polimorfizma, tako da je ena sonda komplementarna nemutiranemu alelu, druga pa mutiranemu. Sondi sta na 5'-koncu označeni z različnima kovalentno vezanima reporterskima barviloma, na 3'-koncu pa z dušilcem. Med stopnjo prileganja pri PCR le v primeru popolnoma komplementarne sonde pride do hibridizacije z matrično DNA in nadalje do odcepitev reporterskega barvila, kar povzroči povečanje karakteristične fluorescence tega barvila (Slika 9). Vzorec tako specifično genotipiziramo z merjenjem intenzitete signala dveh različnih reporterskih barvil po reakciji PCR (77): pri homozigotih za nemutiran alel se pojavi fluorescenca prvega reporterskega barvila, pri homozigotih za mutiran alel poraste fluorescenca drugega reporterskega barvila, medtem ko se pri heterozigotih pojavita fluorescenci obeh barvil.

Vsaka sonda TaqMan vsebuje:

- fluorofor, vezan na 5'-koncu sonde, ki je lahko VIC[®] z emisijskim maksimumom pri 554 nm (vezan na 5'-koncu sonde za alel 1) ali FAM[™] z emisijskim maksimumom pri 518 nm (vezan na 5'-koncu sonde za alel 2).
- nefluorescentni dušilec, ki je vezan na 3'-koncu sonde. Ker dušilec ne fluorescira, lahko sistem za detekcijo sekvence bolj točno izmeri fluorescenco reporterskega barvila.

- vezalec v malem žlebu (minor groove binder, MGB), ki poveča temperaturo tališča ob nespremenjeni dolžini sonde. To omogoča oblikovanje krajših sond. Rezultat je večja razlika v temperaturi tališča med ujemajočo in neujemajočo sondo, kar pomeni večjo specifičnost vezave sonde (78). Kemijsko je vezalec v malem žlebu tripeptid dihidrociklopiroloindol, ki je kovalentno vezan na dušilec na 3'-koncu sonde (79).



Slika 9: Metoda TaqMan. Prirejeno po (80).

3.3.1.1 Genotipizacija za SNP1 in SNP17

Reakcijske komponente za PCR v realnem času:

- vzorčna DNA: priporočena količina čiste genomske DNA je od 1 do 20 ng za posamezno reakcijo.
- TaqMan Universal PCR Master Mix (2-kratne koncentracije in z AmpErase UNG) vsebuje AmpliTaq Gold DNA polimerazo, Mg^{2+} ione, dNTP-je (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dUTP) in pufer. AmpErase[®] uracil-N-glikozilaza (UNG) lahko prepreči neželeno ponovno pomnoževanje PCR produktov, prinesenih iz predhodnih reakcij, tako da odstrani vse uracile, ki so vgrajeni v enojno ali dvojno verižno DNA. Pri tem encim ne razgradi nativne DNA. To je mogoče zaradi vgrajevanja dUTP namesto dTTP tekom PCR pomnoževanja (81). Master Mix smo shranjevali v hladilniku pri +4°C.
- SNP Genotyping Assay Mix (20- ali 40-kratne koncentracije) vsebuje:

- ❖ sekvenčno-specifična oligonukleotidna začetnika (smerni in protismerni), ki omogočata pomnoževanje odseka DNA, kjer se nahaja naš SNP (Slika 10, Slika 11).
- ❖ dve TaqMan[®]-MGB-sondi; sonda, ki je označena z barvilom VIC[®], je komplementarna nemutiranemu alelu, medtem ko je sonda, označena z barvilom FAM[™], komplementarna mutiranemu alelu.

Mešanico sond in oligonukleotidnih začetnikov smo shranjevali v zamrzovalniku pri –20°C in zaščiteno pred svetlobo, saj so fluorescentna barvila občutljiva na svetlobo. Postopke taljenja in ponovnega zamrzovanja smo poskušali zmanjšati na minimum (78).

- ultračista voda, ki smo jo shranjevali v zamrzovalniku.

```
ttccagaaa tagccatagg ctgtagaac aggcacttg ctctgaagg aggctgtt
gttctgagt gtgagctgat ttgcatlggc tcacaaag[c/t]t gaccaagac cctgcatggg
agacacaacc aacacccccca ttgacctgct ggcaagcact tgtgcccccc tcccctcccc
```

Slika 10: Nukleotidno zaporedje dela introna 1 v genu *LPIN1*. **Krepko** je označen polimorfizem SNP1, **zeleno** pa nukleotidno zaporedje, na katerem delujeta oligonukleotidna začetnika in sondi iz SNP Genotyping Assay Mix-a za SNP1.

```
tttgtttt aaggttatgc tagcctcadc gaattaatt ggagatgttc tttttgtt
ttatgctctg tcattcttg ttccctggat gaccagata ac[c/t]cttggtg aaatggctca
tccttggigt tttctttigt agaaaagactt gaaagtacgg gtttactttc catctcgtgc
```

Slika 11: Nukleotidno zaporedje dela introna 17 v genu *LPIN1*. **Krepko** je označen polimorfizem SNP17, **rumeno** pa nukleotidno zaporedje, na katerem delujeta oligonukleotidna začetnika in sondi iz SNP Genotyping Assay Mix-a za SNP17.

Postopek

Zaradi preprečevanja kontaminacije smo imeli ločene prostore, v katerih smo izvajali pripravo vzorcev, pripravo reakcijskih zmesi za PCR in samo PCR reakcijo. Pri delu smo uporabljali sterilno tehniko, kar pomeni, da smo plastičen pribor (eprovete s pokrovčkom in nastavke za pipete) redno avtoklavirali, uporabljali smo rokavice brez smukca in čisto delovno haljo. Zmesi reagentov in delovnih raztopin DNA za PCR reakcijo smo pripravljali v čisti komori za DNA s pipetami, ki so namenjene le pripravi teh reakcijskih zmesi. Pred začetkom dela smo delovne površine komore in ves pribor očistili s 3% natrijevim hipokloritom. Nato smo v komoro zložili ves potreben plastičen pribor in prižgali UV luč za najmanj 15 minut. Medtem smo centrifugirali

in premešali delovne raztopine DNA, ki smo jih sicer shranjevali v hladilniku pri +4°C. Pazili smo, da vzorcev DNA kakor tudi ostalih reagentov nismo izpostavljali UV svetlobi.

Pred pripravo reakcijskih zmesi za PCR smo vsakič sestavili delovni načrt, ki je vključeval potrebne reagente, njihove količine ter količino delovne raztopine DNA, ki je bila odvisna od koncentracije DNA v tej raztopini (Preglednica III, Preglednica IV). Reagente smo pripravili v skupni količini za ustrezno število vzorcev in za vsaj eno slepo zmes, ki je služila za negativno kontrolo. Običajno smo za 23 vzorcev imeli eno slepo, za 30 vzorcev pa dve.

Preden smo začeli delati v komori, smo se preoblekli v haljo namenjeno delu s PCR in nataknili čiste rokavice. Nato smo si pripravili reagente. Ultračisto vodo smo odtalili. Master Mix smo v komori rahlo premešali in centrifugirali. Mešanico sond in oligonukleotidnih začetnikov smo odtalili, premešali in centrifugirali. Za ta reagent smo morali paziti, da je bil pokrit s folijo in da smo ga čimprej vrnili nazaj v zamrzovalnik. V epruveto s pokrovčkom smo nato odpipetirali posamezne reagente v skupni količini za vse vzorce in slepe zmesi. Dobljeno zmes reagentov smo dobro premešali in centrifugirali. Po predpisu (Preglednica III, Preglednica IV) smo pipetirali iz skupne zmesi reagentov ustrezen volumen v posebne med seboj povezane plastične epruvetke (epruvetne trakove ali »stripe«). Nato smo v posamezno epruvetko dodali še ustrezen volumen delovne raztopine DNA. Slepa zmes je vsebovala le zmes reagentov. Ker so bili volumni delovnih raztopin DNA, ki smo jih dodajali v zmes za reakcijo, običajno zelo majhni, smo pri pipetiranju morali biti pozorni, da smo iz nastavka iztisnili vso delovno raztopino DNA. Epruvetne trakove smo nato zaprli s posebnimi pokrovčki in iz epruvetk odstranili morebitne zračne mehurčke. Tako pripravljene reakcijske zmesi smo še dve minuti centrifugirali pri 1900 obratih na minuto. Nato smo epruvetne trakove vstavili v aparat in zagnali ustrezen program za reakcijo PCR. Temperaturno shemo reakcije PCR v realnem času za oba polimorfizma prikazuje Preglednica V.

Preglednica III: Sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo za SNP1 s PCR v realnem času.

reagent	volumen za 1 vzorec [μ l]
TaqMan Universal PCR Master Mix	5
SNP Genotyping Assay Mix (40x)	0,25
ultračista voda	4,45
delovna raztopina DNA	0,3*
Σ	10

Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo za SNP17 s PCR v realnem času.

reagent	volumen za 1 vzorec [μ l]
TaqMan Universal PCR Master Mix	5
SNP Genotyping Assay Mix (20x)	0,5
ultračista voda	4,2
delovna raztopina DNA	0,3*
Σ	10

*Volumni delovnih raztopin DNA so bili tudi drugačni z ozirom na koncentracijo DNA v delovni raztopini. Pri izbiri količine delovne raztopine DNA smo upoštevali priporočilo, da naj bo količina genomske DNA v posamezni reakcijski zmesi od 1 do 20 ng.

Preglednica V: Temperaturna shema reakcije PCR v realnem času za oba polimorfizma.

	Inkubacija za delovanje AmpErase UNG	Aktivacija AmpliTaq Gold DNA polimeraze	PCR	
			CIKEL (40 ali 50 ciklov)	
			denaturacija	prileganje začetnikov/podaljševanje
čas	2 min	10 min	15 s	1 min
temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C

(78)

Pri pregledu rezultatov pomnoževanja in določitvi genotipov za naša dva polimorfizma SNP1 in SNP17 smo upoštevali naslednje: če je porasla samo fluorescenca značilna za fluorofor VIC[®], je to pomenilo, da je oseba homozigot za normalen alel C (C/C); v primeru porasta zgolj fluorescence fluorofora FAM[™] smo potrdili homozigota za mutiran alel T (T/T); povečana fluorescenca obeh fluoroforov pa je pomenila heterozigota z enim normalnim in enim mutiranim alelom (C/T).

Pri genotipizaciji za SNP17 smo imeli težave z nespecifično vezavo sonde komplementarne mutiranemu alelu in označene s fluoroforom FAM[™]. Zato smo zgornje splošne trditve prilagodili dani situaciji: v primeru enakega porasta fluorescenc obeh fluoroforov VIC[®] in FAM[™] smo razglasili homozigota C/C; če je bila fluorescenca fluorofora VIC[®] manjša od fluorescence fluorofora FAM[™], je bil to heterozigot C/T; če pa je porasla zgolj fluorescenca fluorofora FAM[™], je šlo za homozigota T/T.

Ob vsaki analizi smo morali biti še posebej pozorni na odsotnost kakršnega koli pomnoževanja oziroma porasta fluorescence v slepi zmesi.

Po PCR-pomnoževanju smo izvedli še alelno diskriminacijo, s katero smo potrdili genotipe, določene na podlagi rezultatov PCR reakcije. Program na osnovi izmerjenih fluorescenc določi Rn-vrednosti (intenziteta emisije reporterskega barvila, normalizirana glede na pasivno referenco) za posamezen alel za vsak vzorec. Te rezultate predstavi tudi grafično; genotipe vzorcem določimo glede na razporeditev točk na grafu.

Reagenti in oprema

- ◆ ultračista voda (Elga, Purelab)
- ◆ TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems, Roche)
- ◆ SNP Genotyping Assay Mix za SNP1 (40x) (Applied Biosystems)
- ◆ SNP Genotyping Assay Mix za SNP17 (20x) (Applied Biosystems)
- ◆ delovne raztopine DNA
- ◆ avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt)
- ◆ avtoklavirane plastične epruvete s pokrovčkom 0,5 ml (Eppendorf)
- ◆ pipete 0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20-200 µl (Eppendorf)
- ◆ komora za PCR (Biosan)
- ◆ mikrocentrifuga z vorteksom (Biosan)
- ◆ centrifuga 5804R (Eppendorf)
- ◆ centrifuga Mikro-242 (Tehtnica, Železniki)
- ◆ centrifuga Centric 322A (Tehtnica)
- ◆ vorteks EV-202 (Tehtnica, Železniki)
- ◆ ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)
- ◆ Optical Caps (8 Caps/Strip) (Applied Biosystems)
- ◆ Optical Tubes (8 Tubes/Strip) (Applied Biosystems)
- ◆ avtoklav (Kambič laboratorijska oprema)
- ◆ rokavice iz lateksa – brez magnezijevega stearata (Kimberly Clark)

3.4 Statistična analiza

Pri vsaki statistični analizi smo postavili ničelno in alternativno hipotezo:

- H_0 predpostavlja, da se primerjani spremenljivki ne razlikujeta
- H_1 pa predpostavlja, da se spremenljivki razlikujeta.

Če je bila izračunana verjetnost p večja od izbrane stopnje tveganja $\alpha = 0,05$, smo sprejeli ničelno hipotezo. Če pa je bila verjetnost p manjša od stopnje tveganja $\alpha = 0,05$, smo ničelno hipotezo zavrgli in sprejeli alternativno hipotezo.

Za ugotavljanje skladnosti opaženih frekvenc genotipov za oba polimorfizma s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem smo uporabili Courtlab calculator in χ^2 -test (82). Primerljivost genotipskih in alelnih frekvenc med zdravimi in bolnicami s PCOS smo prav tako testirali s χ^2 -testom. Normalnost porazdelitve smo ugotavljali s Kolmogorov-Smirnovim testom. Vse klinične kazalce smo na vpliv genotipov testirali z neparametričnim testom po Kruskal-Wallisovi oziroma z Mann-Whitneyevim testom. Testu po Kruskal-Wallisovi je sledil še Mann-Whitneyev test, s katerim smo primerjali skupini genotipov z največjo razliko srednjih rangov. Vpliv diplotipov na vse klinične kazalce smo analizirali z neparametričnim testom po Kruskal-Wallisovi, posamezne skupine diplotipov pa smo primerjali z Mann-Whitneyevim testom.

Podatke smo analizirali s pomočjo programa SPSS verzija 14.0.

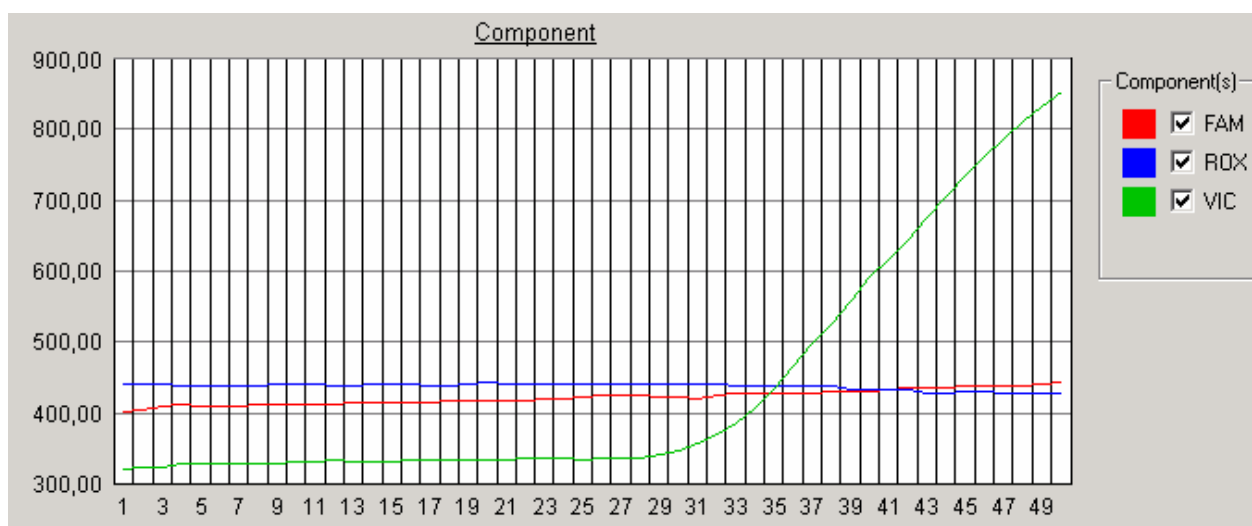
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Eksperimentalno delo

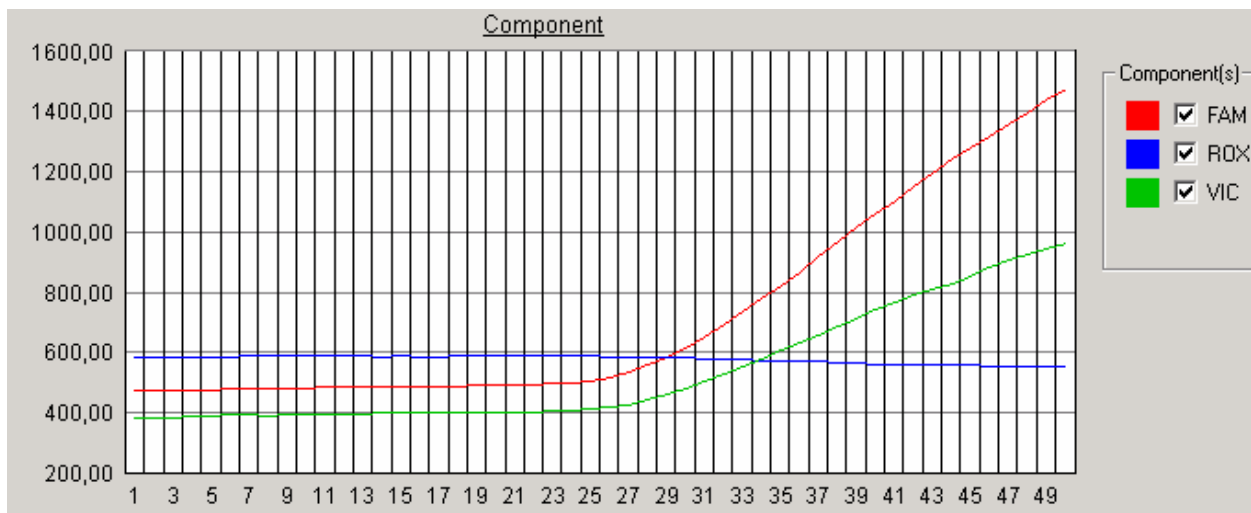
4.1.1 Genotipizacija polimorfizma SNP1

Preiskovanke smo genotipizirali za polimorfizem SNP1 z alelno diskriminacijo s PCR v realnem času (Slika 12, Slika 13, Slika 14). Pri metodi smo spreminjali zgolj količino delovne raztopine DNA, ki smo jo vnašali v zmes za reakcijo, in število ciklov reakcije. Pri tem smo upoštevali priporočilo, da naj bo količina genomske DNA v posamezni reakcijski zmesi od 1 do 20 ng. Veliko večino vzorcev nam je že v prvem poskusu uspelo pomnožiti in jim določiti genotip. Neuspele vzorce smo reševali s spreminjanjem količine DNA v reakcijski zmesi. Volumne delovnih raztopin DNA smo tako ustrezno zmanjšali ali povečali, da smo jih uravnali na 10 ng DNA v posamezni reakcijski zmesi. Visoke koncentracije DNA niso bile uspešne zaradi prisotnih inhibitorjev PCR. Ob tem je bilo potrebno en vzorec še redčiti, da je bil vnos DNA 1 ng, v drugem primeru pa smo morali uporabiti osnovno raztopino DNA.

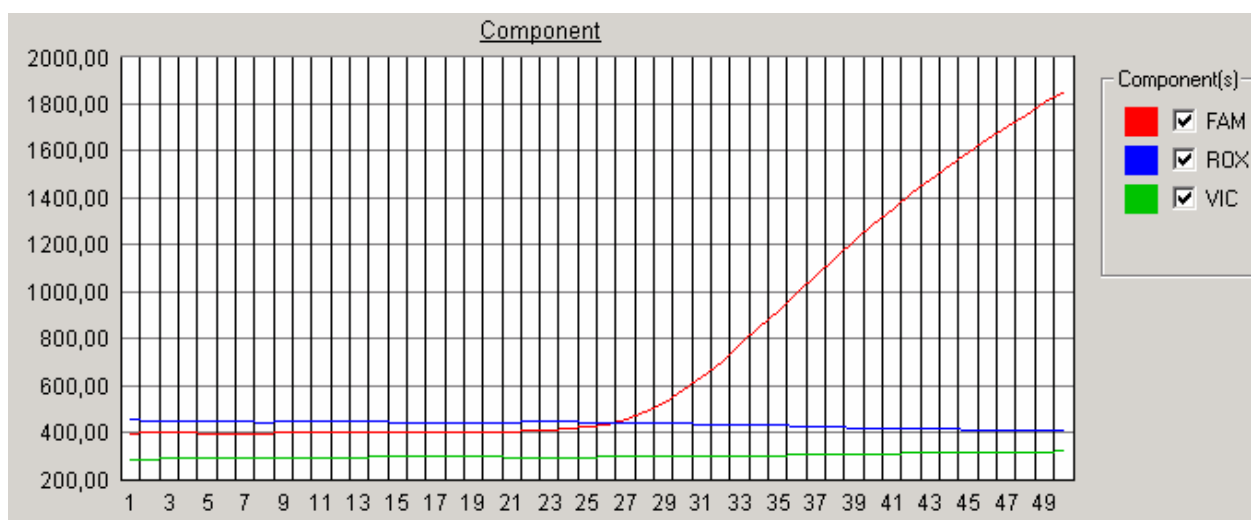
V začetnih serijah analiz smo imeli 40 ciklov reakcije PCR. Ob ponovitvi neuspešnih vzorcev iz druge skupine in v nadaljnjih serijah analiz pa smo število ciklov reakcije povečali na 50. To se nam je zdelo smiselno, saj so se nekateri vzorci z nižjo koncentracijo DNA slabše pomnoževali in smo lahko šele po 50 ciklih jasno razbrali, za kateri genotip gre. Po drugi strani pa smo s tem zgolj podaljšali analizo za 15 minut.



Slika 12: Grafični prikaz rezultata reakcije PCR v realnem času za homozigota C/C polimorfizma SNP1. Rdeča krivulja predstavlja spreminjanje fluorescence fluorofora FAMTM, zelena fluorofora VIC[®]. Modra krivulja pa označuje pasivno referenco ROX.



Slika 13: Grafični prikaz rezultata reakcije PCR v realnem času za heterozigota C/T polimorfizma SNP1.



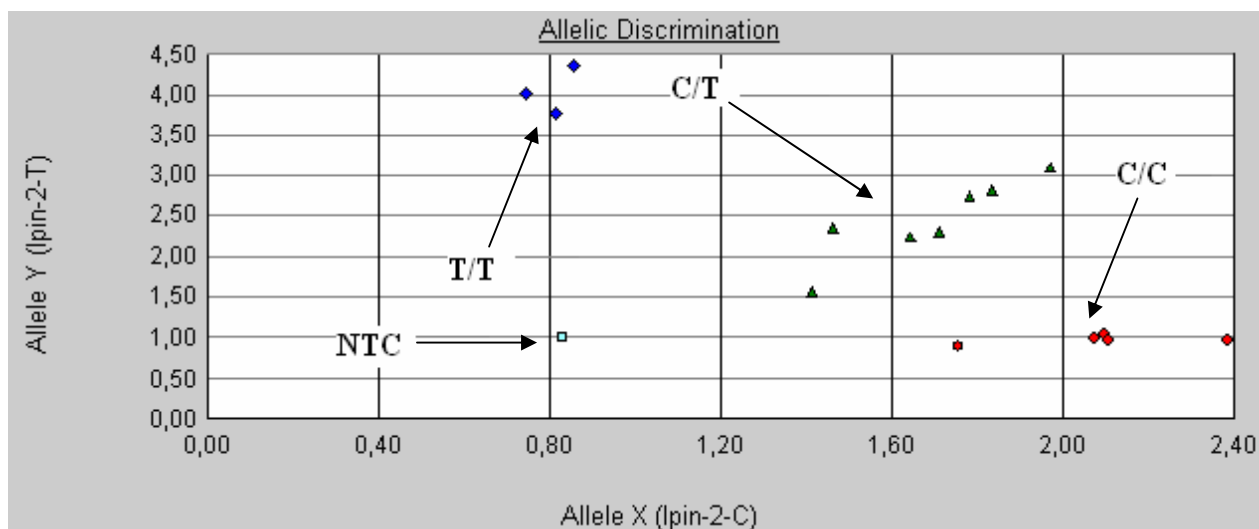
Slika 14: Grafični prikaz rezultata reakcije PCR v realnem času za mutiranega homozigota T/T polimorfizma SNP1.

Detekcijo mutacij smo izvedli z alelno diskriminacijo s sondami TaqMan, označenimi z barvilom VIC[®] na nemutiranem alelu C in barvilom FAM[™] na mutiranem alelu T. Program predstavi rezultate v obliki preglednice (Preglednica VI) in grafično s točkami v koordinatnem sistemu, kjer absciso in ordinato predstavljata fluorescenci posameznega barvila (Slika 15). Genotipe vzorcem določimo glede na razporeditev točk na grafu.

Preglednica VI: Rezultati alelne diskriminacije za polimorfizem SNP1.

Lokacija	Vzorec	Marker	Alel X	Alel Y	Alel X Rn	Alel Y Rn	Razmerje signalov	Rezultat
C2	873	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	1.753	0.902	1.94	lpin-2-C
C3	874	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	1.644	2.241	0.73	Both
C4	875	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	2.097	1.049	2.00	lpin-2-C
C5	876	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	2.074	1.005	2.06	lpin-2-C
C6	877	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	1.710	2.303	0.74	Both
C7	878	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	2.383	0.965	2.47	lpin-2-C
C8	879	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	0.856	4.349	0.20	lpin-2-T
C9	880	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	0.815	3.761	0.22	lpin-2-T
D2	881	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	1.412	1.573	0.90	Both
D3	882	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	2.104	0.979	2.15	lpin-2-C
D4	883	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	1.781	2.748	0.65	Both
D5	884	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	1.834	2.826	0.65	Both
D6	885	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	1.462	2.342	0.62	Both
D7	886	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	1.970	3.104	0.64	Both
D8	887	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	0.744	4.023	0.19	lpin-2-T
D9	NTC	LIPIN-SNP2	lpin-2-C	lpin-2-T	0.828	1.019	0.81	NTC

Vzorci 873, 875, 876, 878 in 882 so nemutirani homozigoti za polimorfizem SNP1, pri njih se razmerje signalov alela X in alela Y giblje okoli vrednosti 2,00. Vzorci 874, 877, 881, 883, 884, 885 in 886 so heterozigoti in imajo razmerje signalov okoli 0,70. Vzorci 879, 880 in 887 pa so mutirani homozigoti, ti imajo najnižje razmerje signalov, in sicer okoli 0,20.

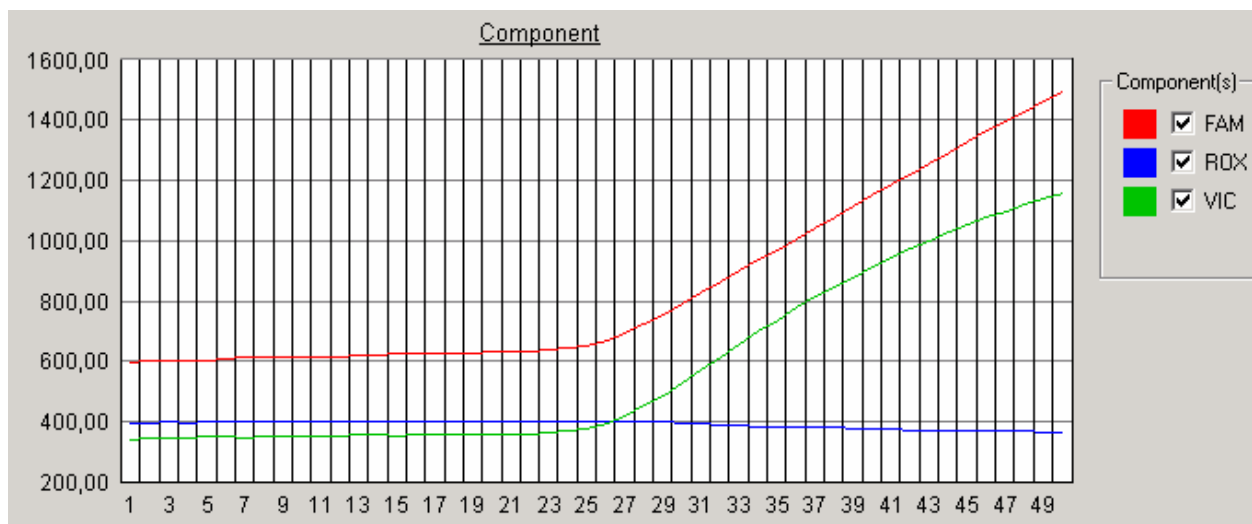


Slika 15: Grafični prikaz rezultatov alelne diskriminacije za polimorfizem SNP1. Rdeča barva predstavlja normalne homozigote C/C, zelena heterozigote C/T, modra mutirane homozigote T/T in svetlo modra predstavlja slepi vzorec.

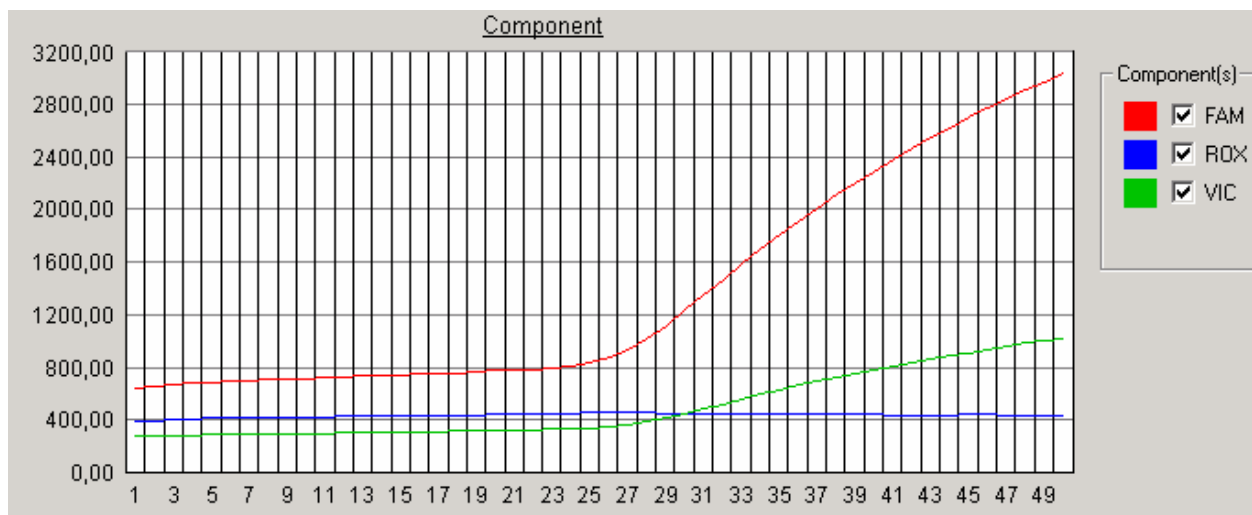
Uspešno smo genotipizirali vseh 371 vzorcev in za SNP1 določili 156 nemutiranih homozigotov C/C (42,1%), 166 heterozigotov C/T (44,7%) in 49 mutiranih homozigotov T/T (13,2%). Rezultate prikazuje Preglednica VIII. Genotipizacijo smo potrdili s ponovitvijo reakcije PCR v realnem času za 30 naključno izbranih vzorcev. Vse ponovitve so se ujemale s prvotno določitvijo.

4.1.2 Genotipizacija polimorfizma SNP17

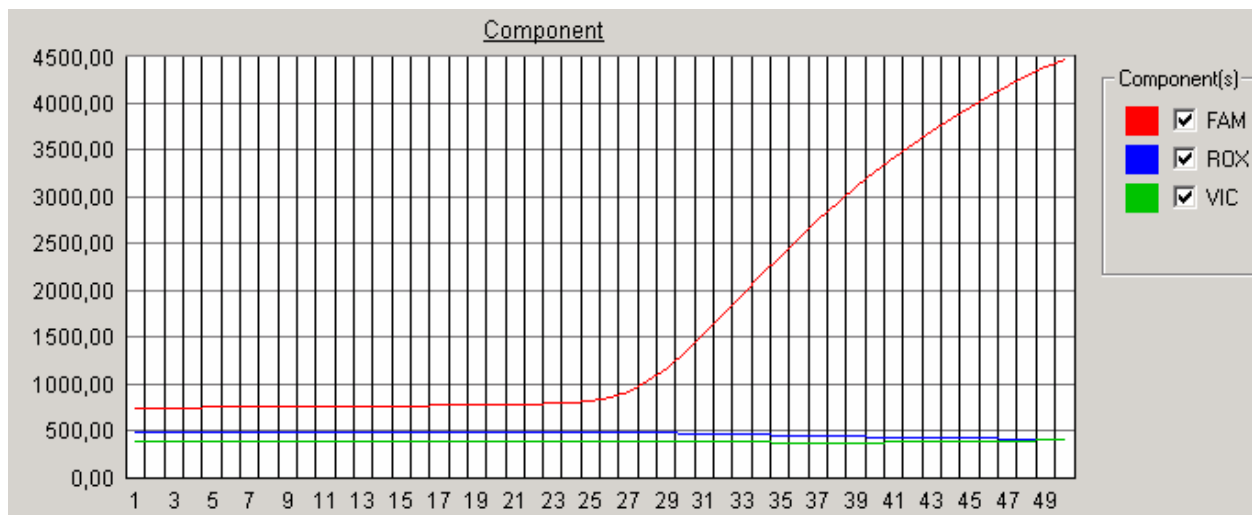
Za polimorfizem SNP17 smo preiskovanke prav tako genotipizirali z alelno diskriminacijo s PCR v realnem času (Slika 16, Slika 17, Slika 18). Pri delu smo izhajali iz količin delovnih raztopin DNA, ki so bile za posamezen vzorec uspešne pri polimorfizmu SNP1. Neuspele vzorce smo reševali na enak način kot pri SNP1. V vseh serijah analiz smo imeli 50 ciklov reakcije PCR.



Slika 16: Grafični prikaz rezultata reakcije PCR v realnem času za homozigota C/C polimorfizma SNP17.



Slika 17: Grafični prikaz rezultata reakcije PCR v realnem času za heterozigota C/T polimorfizma SNP17.



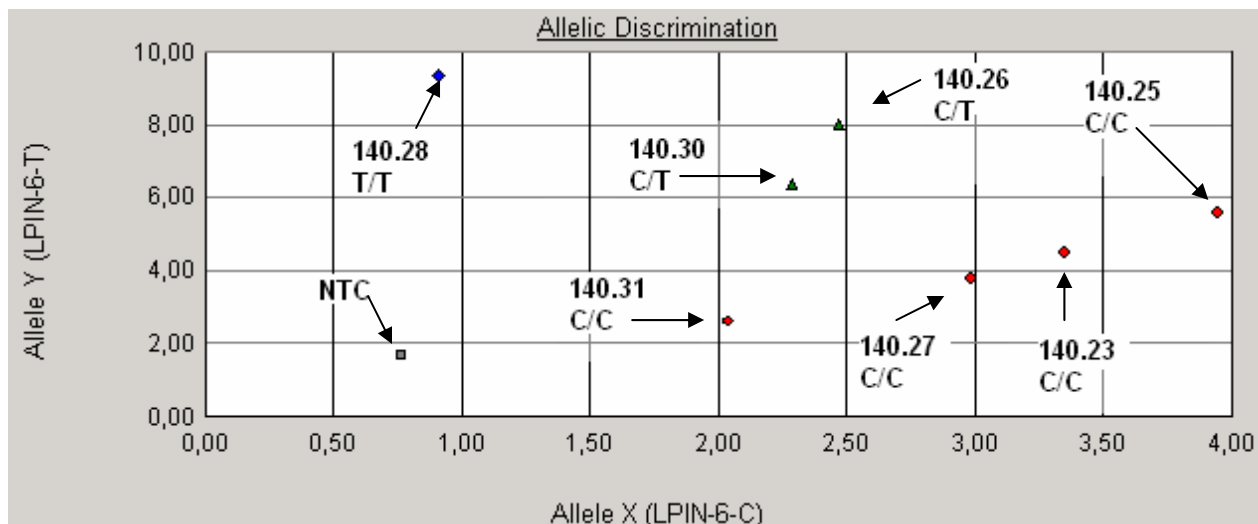
Slika 18: Grafični prikaz rezultata reakcije PCR v realnem času za mutiranega homozigota T/T polimorfizma SNP17.

Preglednica VII in Slika 19 prikazujeta rezultate alelne diskriminacije za polimorfizem SNP17, kjer smo prav tako uporabili sonde TaqMan, označene z barvilom VIC[®] na nemutiranem alelu C in barvilom FAM[™] na mutiranem alelu T.

Preglednica VII: Rezultati alelne diskriminacije za polimorfizem SNP17.

Lokacija	Vzorec	Marker	Alel X	Alel Y	Alel X Rn	Alel Y Rn	Razmerje signalov	Rezultat
A3	140.23	LIPIN-SNP6	LPIN-6-C	LPIN-6-T	3.347	4.493	0.75	LPIN-6-C
A4	140.25	LIPIN-SNP6	LPIN-6-C	LPIN-6-T	3.942	5.591	0.71	LPIN-6-C
A5	140.26	LIPIN-SNP6	LPIN-6-C	LPIN-6-T	2.467	8.009	0.31	Both
A6	140.27	LIPIN-SNP6	LPIN-6-C	LPIN-6-T	2.978	3.812	0.78	LPIN-6-C
A7	140.28	LIPIN-SNP6	LPIN-6-C	LPIN-6-T	0.906	9.363	0.10	LPIN-6-T
A8	140.30	LIPIN-SNP6	LPIN-6-C	LPIN-6-T	2.285	6.380	0.36	Both
A9	140.31	LIPIN-SNP6	LPIN-6-C	LPIN-6-T	2.036	2.623	0.78	LPIN-6-C
A10	NTC	LIPIN-SNP6	LPIN-6-C	LPIN-6-T	0.760	1.719	0.44	NTC

Vzorci 140.31, 140.27, 140.23 in 140.25 so nemutirani homozigoti za polimorfizem SNP17. Razmerje signalov alela X in alela Y se pri njih giblje okoli vrednosti 0,75. Vzorca 140.30 in 140.26 sta heterozigota in imata razmerje signalov okoli 0,35. Vzorec 140.28 pa je mutiran homozigot, ti imajo najnižje razmerje signalov, in sicer okoli 0,10.



Slika 19: Grafični prikaz rezultatov alelne diskriminacije za polimorfizem SNP17. Rdeča barva predstavlja normalne homozigote, zelena heterozigote, modra mutirane homozigote in siva slepi vzorec.

Uspelo nam je genotipizirati vseh 371 vzorcev. Za SNP17 smo določili 251 nemutiranih homozigotov C/C (67,7%), 108 heterozigotov C/T (29,1%) in 12 mutiranih homozigotov T/T (3,2%). Rezultate prikazuje Preglednica VIII. Genotipizacijo smo potrdili s ponovitvijo reakcije PCR v realnem času za 30 naključno izbranih vzorcev. Vse ponovitve so se ujemale s prvotno določitvijo.

Preglednica VIII: Genotipske frekvence določene na populaciji 371 preiskovank za oba polimorfizma.

genotip	genotipske frekvence za SNP1	genotipske frekvence za SNP17
C/C	156 (42,1%)	251 (67,7%)
C/T	166 (44,7%)	108 (29,1%)
T/T	49 (13,2%)	12 (3,2%)

4.2 Ocena klinične pomembnosti polimorfizmov SNP1 in SNP17

4.2.1 Ugotavljanje skladnosti s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem

Hardy-Weinbergov teorem pravi, da se alelne in genotipske frekvence med generacijami ne razlikujejo. Da je populacija v Hardy-Weinbergovem ravnotežju, morajo biti izpolnjeni sledeči pogoji: populacija mora biti velika, parjenje mora biti naključno, ne sme prihajati do migracij, mutacij in naravne selekcije. Če je p frekvenca nemutiranega alela in q mutiranega alela, potem so pričakovane genotipske frekvence nemutiranih homozigotov, heterozigotov in homozigotov z mutacijo sledeče: p^2 , $2pq$ in q^2 . V tem primeru je populacija v Hardy-Weinbergovem ravnotežju (83).

S statističnim testom χ^2 smo želeli ugotoviti ali se opažene frekvence genotipov za oba polimorfizma skladajo s frekvencami, ki so pričakovane po Hardy-Weinbergovem ravnotežju, tako pri bolnicah s PCOS kot pri zdravih preiskovankah.

Postavili smo ničelno in alternativno hipotezo za posamezen polimorfizem:

- H_0 : Genotipske frekvence bolnic s PCOS in zdravih preiskovank se ne razlikujejo od pričakovanih genotipskih frekvenc.
- H_1 : Genotipske frekvence bolnic s PCOS in zdravih preiskovank se razlikujejo od pričakovanih genotipskih frekvenc.

Ker je vrednost $p > 0,05$ pri bolnicah in pri zdravih preiskovankah za oba polimorfizma (Preglednica IX in Preglednica X), lahko sprejmemo ničelno hipotezo. Pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$ se torej opažene genotipske frekvence značilno ne razlikujejo od pričakovanih, ki so izračunane iz alelnih frekvenc z upoštevanjem Hardy-Weinbergovih razmerij. Genotipske frekvence bolnic s PCOS in zdravih preiskovank za oba polimorfizma so tako v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

Preglednica IX: Število opaženih in pričakovanih genotipov pri bolnicah in zdravih preiskovankah za polimorfizem SNP1.

genotip za SNP1	genotipske frekvence bolnic s PCOS		genotipske frekvence zdravih preiskovank	
	opažene	pričakovane (Hardy- Weinbergovo ravnotežje)	opažene	pričakovane (Hardy- Weinbergovo ravnotežje)
C/C	89	89,6	67	64,5
C/T	104	102,9	62	67,1
T/T	29	29,6	20	17,5
	p = 0,987		p = 0,652	

Preglednica X: Število opaženih in pričakovanih genotipov pri bolnicah in zdravih preiskovankah za polimorfizem SNP17.

genotip za SNP17	genotipske frekvence bolnic s PCOS		genotipske frekvence zdravih preiskovank	
	opažene	pričakovane (Hardy- Weinbergovo ravnotežje)	opažene	pričakovane (Hardy- Weinbergovo ravnotežje)
C/C	146	147,6	105	103,2
C/T	70	66,9	38	41,6
T/T	6	7,6	6	4,2
	p = 0,782		p = 0,571	

4.2.2 Pogostost polimorfizmov SNP1 in SNP17 pri bolnicah s PCOS ter zdravih preiskovankah

Da bi raziskali vpliv posameznega polimorfizma na PCOS, smo primerjali genotipske in alelne frekvence bolnic s PCOS in zdravih preiskovank.

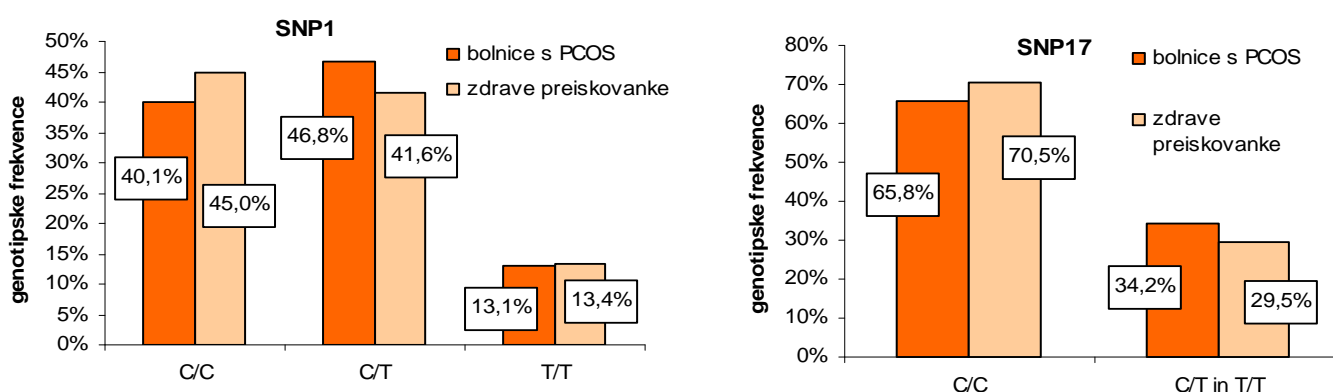
Postavili smo ničelno in alternativno hipotezo za posamezen polimorfizem:

- H_0 : Genotipske frekvence med bolnicami s PCOS in zdravimi preiskovankami se ne razlikujejo.
- H_1 : Genotipske frekvence med bolnicami s PCOS in zdravimi preiskovankami se razlikujejo.

Za izračun smo uporabili Pearsonov χ^2 -test, saj so bile vse frekvence večje od 5. Za polimorfizem SNP17 smo določili 6 mutiranih homozigotov v skupini bolnic in 6 v skupini zdravih preiskovank; za statistično analizo smo jih priključili k heterozigotom. Rezultate prikazuje Preglednica XI. Ker je bil $p > 0,05$ pri obeh polimorfizmih, smo sprejeli ničelno hipotezo, ki pravi, da se pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$ genotipske frekvence bolnic s PCOS in zdravih preiskovank značilno ne razlikujejo. Genotipske frekvence (Slika 20) tako niso povezane s prisotnostjo PCOS.

Preglednica XI: Genotipske frekvence bolnic s PCOS in zdravih preiskovank za oba polimorfizma.

	SNP1			SNP17	
	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T in T/T
bolnice s PCOS	89 (40,1%)	104 (46,8%)	29 (13,1%)	146 (65,8%)	76 (34,2%)
zdrave preiskovanke	67 (45,0%)	62 (41,6%)	20 (13,4%)	105 (70,5%)	44 (29,5%)
	p = 0,589			p = 0,342	



Slika 20: Genotipske frekvence za oba polimorfizma.

Za primerjavo alelnih frekvenc smo postavili ničelno in alternativno hipotezo za posamezen polimorfizem:

→ H_0 : Alelni frekvence med bolnicami s PCOS in zdravimi preiskovankami se ne razlikujejo.

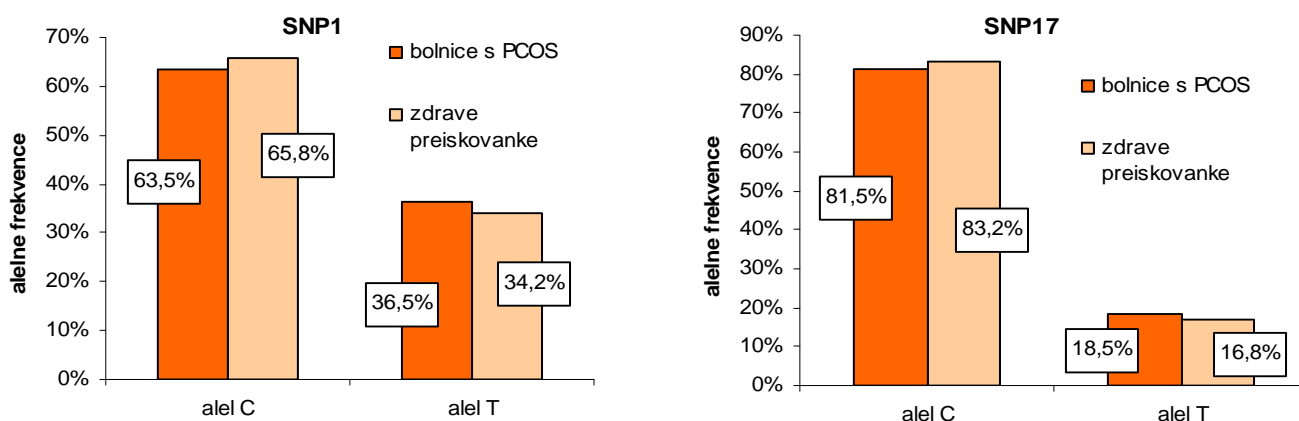
→ H_1 : Alelni frekvence med bolnicami s PCOS in zdravimi preiskovankami se razlikujejo.

Za obravnavo hipotez smo uporabili Pearsonov χ^2 -test. Ker je bil $p > 0,05$ pri obeh polimorfizmih (Preglednica XII), smo sprejeli ničelno hipotezo, ki pravi, da se pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$ alelni frekvence bolnic s PCOS in zdravih preiskovank značilno ne razlikujejo.

Alelni frekvence (Slika 21) torej niso povezane s prisotnostjo PCOS.

Preglednica XII: Alelne frekvence bolnic s PCOS in zdravih preiskovank za oba polimorfizma.

	SNP1		SNP17	
	alel C	alel T	alel C	alel T
bolnice s PCOS	282 (63,5%)	162 (36,5%)	362 (81,5%)	82 (18,5%)
zdrave preiskovanke	196 (65,8%)	102 (34,2%)	248 (83,2%)	50 (16,8%)
	p = 0,529		p = 0,555	

**Slika 21:** Alelne frekvence za oba polimorfizma.

Želeli smo preučiti tudi vpliv polimorfizmov SNP1 in SNP17 na pojav IR pri bolnicah s PCOS. Zato smo za oba polimorfizma določili genotipske frekvence v podskupini bolnic s PCOS in IR in jih primerjali s frekvencami v podskupini zdravih preiskovank brez PCOS in brez IR. Za inzulinsko rezistentne smo določili tiste preiskovanke, ki so imele indeks HOMA $\geq 2,0$. Te vrednosti ne smemo jemati kot absolutno, saj je inzulinska rezistenca zvezen parameter.

Postavili smo ničelno in alternativno hipotezo za posamezen polimorfizem:

- H_0 : Genotipske frekvence med bolnicami s PCOS in IR in zdravimi preiskovankami brez PCOS in brez IR se ne razlikujejo.
- H_1 : Genotipske frekvence med bolnicami s PCOS in IR in zdravimi preiskovankami brez PCOS in brez IR se razlikujejo.

Za obravnavo hipotez smo ponovno uporabili Pearsonov χ^2 -test (Preglednica XIII). Za polimorfizem SNP1 smo določili mejno signifikantno vrednost p (0,085), kar nakazuje vpliv tega polimorfizma na pojav kombinacije PCOS in IR. Pri polimorfizmu SNP17 pa je p večji od stopnje tveganja ($\alpha = 0,05$), zato smo sprejeli ničelno hipotezo. Ta polimorfizem nima vpliva na pojav kombinacije PCOS in IR.

Preglednica XIII: Genotipske frekvence bolnic s PCOS in IR in zdravih preiskovank brez PCOS in IR za oba polimorfizma.

	SNP1			SNP17	
	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T in T/T
bolnice s PCOS in IR	23 (30,3%)	45 (59,2%)	8 (10,5%)	49 (64,5%)	27 (35,5%)
zdrave preiskovanke brez PCOS in IR	58 (44,3%)	57 (43,5%)	16 (12,2%)	91 (69,5%)	40 (30,5%)
	p = 0,085*			p = 0,459	

* mejno značilna signifikanca

Naše rezultate smo primerjali z izsledki drugih študij:

Alelne frekvence za alel T polimorfizma SNP1 so pri naših preiskovankah 36,5% za bolnice s PCOS in 34,2% za zdrave preiskovanke. Nekoliko višjo alelno frekvenco (40%) so določili pri finskih družinah z dislipidemijo (69). Alelne frekvence za Afroameričane, Kavkazijce, Kitajce in Japonce pa znašajo 10%, 32%, 74% in 77% (71), kar nakazuje močan vpliv rase na pogostost pojavljanja polimorfizma SNP1 v populaciji.

Statistična analiza je pokazala, da pri PCOS ni večje pogostosti polimorfizma SNP1; določili pa smo nakazano značilno razliko v genotipskih frekvencah med bolnicami s PCOS in IR ter zdravimi preiskovankami brez PCOS in IR. To se sklada z ugotovljenim vplivom polimorfizma SNP1 na glukozno homeostazo v vzorcu finskih dislipidemičnih družin (69), medtem ko povezava tega polimorfizma s PCOS še ni raziskana.

Alelne frekvence za alel T polimorfizma SNP17 so pri naših preiskovankah 18,5% za bolnice s PCOS in 16,8% za zdrave preiskovanke. Nižjo alelno frekvenco (10%) so določili v finskih dislipidemičnih družinah (69). Alelne frekvence za Evropejce, Afroameričane in Azijce znašajo 29,5%, 45,2% in 18,8% (70). Nakazuje se vpliv črnske rase na višjo alelno frekvenco polimorfizma SNP17, medtem ko je ta pri belcih in Azijcih zelo podobna.

S primerjavo genotipskih in alelnih frekvenc med bolnicami s PCOS in zdravimi preiskovankami smo ugotovili, da pri PCOS ni večje pogostosti polimorfizma SNP17. Povezava tega polimorfizma s PCOS še ni raziskana, ugotovili pa so njegovo večjo pogostost pri debelih (BMI>30kg/m²) v primerjavi s suhimi (BMI=20-25kg/m²) finskimi posamezniki (69).

4.2.3 Ugotavljanje povezanosti polimorfizmov SNP1 in SNP17 s kliničnimi in biokemičnimi kazalci IR in PCOS

Preverjali smo vpliv polimorfizmov na BMI, glukozo na tešče, inzulin na tešče, HOMA indeks, SHBG, androgene (skupni testosteron (Tsk), prosti testosteron, androstendion, dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEAS)) in lipide (trigliceridi (TAG), celokupni holesterol, HDL-holesterol, LDL-holesterol). Glukoza v serumu je bila izmerjena z GOD-PAP metodo, inzulin pa z imunoradiometrično metodo (IRMA). Za merjenje koncentracije SHBG so uporabili kemiluminiscenčno imunometrično metodo, za določitev posameznih androgenov v serumu pa radioimunski test (RIA). Lipidi v serumu so bili določeni z rutinskimi laboratorijskimi metodami. Po pričakovanjih smo pri bolnicah s PCOS opazili značilno višje vrednosti BMI, inzulina na tešče, indeksa HOMA, androgenov, trigliceridov in LDL-holesterola v serumu v primerjavi z zdravimi preiskovankami. Bolnice so imele tudi značilno nižje koncentracije SHBG in HDL-holesterola v serumu. Razlik v serumski koncentraciji glukoze na tešče in celokupnega holesterola med skupinama preiskovank pa nismo opazili.

V podskupini bolnic s PCOS smo odkrili le 34,4% takih, ki imajo hkrati tudi IR, kar je manj kot 50-70%, kot navajajo drugi avtorji (36).

Da bi lahko preučili vpliv polimorfizmov na klinične in biokemične kazalce, smo najprej preverili, če se le-ti porazdeljujejo normalno. Normalnost porazdelitve smo ugotavljali s Kolmogorov-Smirnovim testom za vsak genotip posebej znotraj ločenih podskupin bolnic s PCOS in zdravih preiskovank. Pri polimorfizmu SNP1 smo obravnavali genotipe C/C, C/T in T/T, pri polimorfizmu SNP17 pa genotip brez mutiranega alela C/C, mutirane homozigote in heterozigote pa smo združili v »genotip z vsaj enim mutiranim alelom X/T«.

Postavili smo ničelno in alternativno hipotezo za posamezen genotip znotraj dveh podskupin preiskovank za vsak polimorfizem posebej:

→ H_0 : Spremenljivka se porazdeljuje normalno.

→ H_1 : Spremenljivka se ne porazdeljuje normalno.

Rezultate testa po Kolmogorov-Smirnovu prikazuje Preglednica XIV. Za klinične kazalce, ki imajo $p > 0,05$, smo sprejeli ničelno hipotezo, ki pravi, da se te spremenljivke pri izbrani stopnji tveganja $\alpha = 0,05$ porazdeljujejo normalno. Za klinične kazalce, ki imajo $p < 0,05$, pa smo zavrnilo ničelno in sprejeli alternativno hipotezo, ki pravi, da se te spremenljivke pri izbrani stopnji tveganja $\alpha = 0,05$ ne porazdeljujejo normalno.

Če se je spremenljivka porazdeljevala normalno v vseh skupinah testiranih genotipov za posamezno podskupino preiskovank pri določenem polimorfizmu, smo zaključili, da se porazdeljuje normalno v celotni testirani populaciji. Pri spremenljivkah, ki se niso porazdeljevale normalno, smo testirali še logaritmirane vrednosti.

Preglednica XIV: Testiranje porazdelitve podatkov s Kolmogorov-Smirnovim testom (preglednica prikazuje vrednosti p). Oranžno so označene signifikance, ki kažejo nenormalno porazdelitev pri določenih spremenljivkah.

spremenljivka	SNP1						SNP17			
	bolnice s PCOS			zdrave preiskovanke			bolnice s PCOS		zdrave preiskovanke	
	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	C/C	X/T	C/C	X/T
inzulin na tešče	0,000	0,000	0,069	0,576	0,683	0,849	0,000	0,000	0,552	0,784
ln ins	0,034	0,046	0,712				0,001	0,039		
glukoza na tešče	0,087	0,813	0,809	0,631	0,150	0,998	0,190	0,612	0,553	0,197
HOMA	0,000	0,000	0,109	0,233	0,952	0,802	0,000	0,000	0,672	0,428
ln HOMA	0,017	0,066	0,861				0,026	0,020		
BMI	0,003	0,004	0,062	0,010	0,480	0,883	0,000	0,022	0,016	0,487
ln BMI	0,019	0,025	0,114	0,044	0,529	0,936	0,000	0,165	0,070	0,516
SHBG	0,199	0,426	0,680	0,912	0,440	0,517	0,355	0,741	0,649	0,713
skupni testosteron	0,168	0,013	0,560	0,158	0,194	0,316	0,006	0,213	0,124	0,352
ln Tsk	0,317	0,520	0,995				0,519	0,913		
prosti testosteron	0,635	0,666	0,884	0,691	0,906	1,000	0,281	0,571	0,338	0,647
androstendion	0,182	0,011	0,092	0,809	0,130	0,941	0,004	0,081	0,436	0,284
ln and	0,870	0,333	0,402				0,191	0,672		
DHEAS	0,291	0,040	0,798	0,337	0,144	0,444	0,014	0,191	0,108	0,159
ln DHEAS	0,055	0,610	0,927				0,301	0,765		
trigliceridi	0,234	0,012	0,567	0,212	0,208	0,527	0,077	0,005	0,080	0,944
ln TAG	0,800	0,355	0,961				0,511	0,236		
celokup. holesterol	0,972	0,337	0,952	0,392	0,961	0,947	0,309	0,679	0,520	0,959
HDL-holesterol	0,131	0,311	0,905	0,997	0,615	0,878	0,336	0,234	0,916	0,945
LDL-holesterol	0,990	0,499	0,245	0,186	0,430	0,540	0,469	0,402	0,246	0,947

Spremenljivke, ki so označene v Preglednici XIV, se niso porazdeljevale normalno; to so:

- ❖ inzulin, HOMA pri bolnicah s PCOS za SNP1 in SNP17,
- ❖ BMI pri bolnicah s PCOS za SNP1 in SNP17 ter pri zdravih preiskovankah za SNP1.

Ker se niso vse spremenljivke porazdeljevale normalno, smo enotno delali neparametrične statistične teste: test po Kruskal-Wallis v primeru polimorfizma SNP1, kjer smo imeli tri

skupine genotipov, in Mann-Whitneyev test v primeru polimorfizma SNP17, kjer smo primerjali dve skupini genotipov. Bolnice s PCOS in zdrave preiskovanke smo obravnavali ločeno.

Postavili smo ničelno in alternativno hipotezo:

→ H_0 : Genotip ne vpliva na vrednost kliničnega kazalca.

→ H_1 : Genotip vpliva na vrednost kliničnega kazalca.

Rezultate testa po Kruskal-Wallisov prikazuje Preglednica XV. Za klinične kazalce, ki imajo $p > 0,05$, smo sprejeli ničelno hipotezo; genotip pri izbrani stopnji tveganja $\alpha = 0,05$ ne vpliva na vrednost teh kliničnih kazalcev. Določili smo mejno signifikantno vrednost $p = 0,089$ za povezavo BMI pri bolnicah s PCOS s polimorfizmom SNP1. Razlika med genotipi je v tem primeru le nakazana. Nato smo z Mann-Whitneyevim testom ugotavljali razliko med skupino z genotipom CC in skupino z genotipom CT ter določili signifikantno vrednost $p = 0,027$. Bolnice z genotipom CC polimorfizma SNP1 imajo torej značilno nižji BMI kot bolnice z genotipom CT in s tem metabolično ugodnejši fenotip. LDL-holesterol pri zdravih preiskovankah pri SNP1 ima $p < 0,05$, zato smo zavrgli ničelno in sprejeli alternativno hipotezo; genotip značilno vpliva na ta klinični kazalec pri izbrani stopnji tveganja $\alpha = 0,05$. Z Mann-Whitneyevim testom smo nato ugotovili, da imajo zdrave preiskovanke z genotipom TT polimorfizma SNP1 nakazano ($p = 0,061$) nižje vrednosti LDL-holesterola v serumu kot preiskovanke z genotipom CC in s tem metabolično ugodnejši fenotip. Pri bolnicah s PCOS smo za inzulin na tešče, indeks HOMA, SHBG in DHEAS pri SNP1 z Mann-Whitneyevim testom določili mejno signifikantne vrednosti $p = 0,088$, $p = 0,057$, $p = 0,063$ in $p = 0,072$. Bolnice z genotipom TT polimorfizma SNP1 imajo tako nakazano nižji inzulin na tešče, indeks HOMA in nakazano višje vrednosti SHBG v serumu kot bolnice z genotipom CT in s tem metabolično ugodnejši fenotip. Nižje vrednosti SHBG so neugodne, saj pride zaradi manjšega števila vezalnih mest do večje biorazpoložljivosti androgenov in s tem do večje verjetnosti za pojav hiperandrogenizacije. Po drugi strani pa imajo bolnice z genotipom CC polimorfizma SNP1 nakazano nižje vrednosti DHEAS v serumu kot bolnice z genotipom TT in s tem metabolično ugodnejši fenotip.

Preglednica XV: Rezultati neparametričnega testa po Kruskal-Wallisov za SNP1 ter primerjave posameznih genotipov z Mann-Whitneyevim testom.

Kruskal-Wallis-SNP1					
klinični kazalec	podskupina preiskovank	genotip	N	srednji rang	p
inzulin na tešče [mU/L]	zdrave	CC	67	74,4	0,930
		CT	62	76,4	
		TT	20	72,6	
inzulin na tešče [mU/L]	bolnice s PCOS	CC	88	106,2	0,135
		CT	104	119,4	

		TT	29	95,5	
		Mann-Whitneyev test	CT : TT		0,088*
glukoza na tešče [mmol/L]	zdrave	CC	67	70,7	0,310
		CT	62	81,4	
		TT	20	69,5	
glukoza na tešče [mmol/L]	bolnice s PCOS	CC	89	107,0	0,159
		CT	104	119,6	
		TT	29	96,4	
HOMA	zdrave	CC	67	71,1	0,582
		CT	62	79,0	
		TT	20	75,8	
HOMA	bolnice s PCOS	CC	88	107,5	0,121
		CT	104	119,0	
		TT	29	92,9	
		Mann-Whitneyev test	CT : TT		0,057*
BMI [kg/m ²]	zdrave	CC	67	80,1	0,341
		CT	62	72,7	
		TT	20	65,2	
BMI [kg/m ²]	bolnice s PCOS	CC	89	100,8	0,089*
		CT	104	121,2	
		TT	29	109,5	
		Mann-Whitneyev test	CC : CT		0,027**
SHBG [nmol/L]	zdrave	CC	58	62,8	0,404
		CT	56	69,5	
		TT	20	75,4	
SHBG [nmol/L]	bolnice s PCOS	CC	82	101,8	0,202
		CT	91	94,5	
		TT	27	116,9	
		Mann-Whitneyev test	CT : TT		0,063*
skupni testosteron [nmol/L]	zdrave	CC	63	72,5	0,600
		CT	59	71,1	
		TT	18	61,7	
skupni testosteron [nmol/L]	bolnice s PCOS	CC	89	104,9	0,436
		CT	104	115,0	
		TT	29	119,2	
prosti testosteron [pmol/L]	zdrave	CC	20	25,6	0,163
		CT	18	17,8	
		TT	5	22,7	
prosti testosteron [pmol/L]	bolnice s PCOS	CC	32	40,8	0,332
		CT	47	49,5	
		TT	13	49,7	

androstendion [nmol/L]	zdrave	CC	67	78,8	0,393
		CT	62	69,3	
		TT	20	80,0	
androstendion [nmol/L]	bolnice s PCOS	CC	89	113,4	0,927
		CT	104	110,7	
		TT	29	108,5	
DHEAS [μmol/L]	zdrave	CC	67	78,3	0,182
		CT	61	67,1	
		TT	20	84,4	
DHEAS [μmol/L]	bolnice s PCOS	CC	89	102,0	0,141
		CT	104	115,4	
		TT	29	126,5	
	Mann-Whitneyev test	CC : TT			0,072*
trigliceridi [mmol/L]	zdrave	CC	20	22,4	0,652
		CT	18	22,9	
		TT	5	17,2	
trigliceridi [mmol/L]	bolnice s PCOS	CC	33	42,6	0,320
		CT	47	51,2	
		TT	13	43,2	
celokup. holesterol [mmol/L]	zdrave	CC	20	25,0	0,279
		CT	18	20,4	
		TT	5	16,0	
celokup. holesterol [mmol/L]	bolnice s PCOS	CC	33	47,0	0,992
		CT	47	47,3	
		TT	13	46,2	
HDL-holesterol [mmol/L]	zdrave	CC	20	20,5	0,609
		CT	18	24,2	
		TT	5	19,9	
HDL-holesterol [mmol/L]	bolnice s PCOS	CC	33	50,2	0,655
		CT	47	45,8	
		TT	13	43,1	
LDL-holesterol [mmol/L]	zdrave	CC	20	27,2	0,041**
		CT	18	17,6	
		TT	5	17,1	
	Mann-Whitneyev test	CC : TT			0,061*
LDL-holesterol [mmol/L]	bolnice s PCOS	CC	33	47,8	0,935
		CT	47	47,1	
		TT	13	44,6	

* mejno značilna signifikanca

** značilna signifikanca

Rezultate Mann-Whitneyevega testa za SNP17 prikazuje Preglednica XVI. Za klinične kazalce, ki imajo $p > 0,05$, smo sprejeli ničelno hipotezo; genotip pri izbrani stopnji tveganja $\alpha = 0,05$ ne vpliva na vrednost teh kliničnih kazalcev. Določili smo $p < 0,05$ za trigliceride pri zdravih preiskovankah, zato smo zavrgli ničelno hipotezo in sprejeli alternativno hipotezo; genotip značilno vpliva na ta klinični kazalec pri izbrani stopnji tveganja $\alpha = 0,05$. Zdrave preiskovanke brez alela T polimorfizma SNP17 imajo signifikantno nižje vrednosti trigliceridov v serumu kot preiskovanke z alelom T in s tem metabolično ugodnejši fenotip.

Pri polimorfizmu SNP17 smo z Mann-Whitneyevim testom ločeno analizirali še bolnice s PCOS in IR ter bolnice s PCOS brez IR (Preglednica XVI). Za inzulinsko rezistentne smo določili tiste preiskovanke, ki so imele indeks HOMA $\geq 2,0$. Inzulin na tešče in indeks HOMA imata v skupini bolnic s PCOS in IR $p < 0,05$, zato smo zavrgli ničelno in sprejeli alternativno hipotezo; genotip značilno vpliva na ta dva klinična kazalca pri izbrani stopnji tveganja $\alpha = 0,05$. Preiskovanke s PCOS in IR brez alela T polimorfizma SNP17 imajo signifikantno nižji inzulin na tešče in indeks HOMA v primerjavi s preiskovankami z alelom T in tako metabolično ugodnejši fenotip. Določili smo tudi mejno signifikantno vrednost $p = 0,054$ za skupni testosteron v skupini bolnic s PCOS brez IR. V tem primeru je, nasprotno, genotip z alelom T polimorfizma SNP17 ugodnejši, saj imajo bolnice s PCOS brez IR s tem genotipom nakazano nižje vrednosti skupnega testosterona v serumu kot bolnice brez alela T.

Preglednica XVI: Rezultati neparametričnega Mann-Whitneyevega testa za SNP17.

Mann-Whitney-SNP17					
klinični kazalec	podskupina preiskovank	genotip	N	srednji rang	p
inzulin na tešče [mU/L]	zdrave	brez alela T	105	75,2	0,945
		z alelom T	44	74,6	
inzulin na tešče [mU/L]	bolnice s PCOS	brez alela T	145	106,9	0,184
		z alelom T	76	118,9	
glukoza na tešče [mmol/L]	zdrave	brez alela T	105	76,7	0,459
		z alelom T	44	71,0	
glukoza na tešče [mmol/L]	bolnice s PCOS	brez alela T	146	112,8	0,666
		z alelom T	76	108,9	
HOMA	zdrave	brez alela T	105	77,3	0,309
		z alelom T	44	69,4	
HOMA	bolnice s PCOS	brez alela T	145	108,2	0,362
		z alelom T	76	116,4	
BMI [kg/m ²]	zdrave	brez alela T	105	77,8	0,214
		z alelom T	44	68,2	
BMI	bolnice s PCOS	brez alela T	146	112,3	0,809

[kg/m ²]		z alelom T	76	110,1	
SHBG [nmol/L]	zdrave	brez alela T	94	70,1	0,236
		z alelom T	40	61,4	
SHBG [nmol/L]	bolnice s PCOS	brez alela T	130	100,5	0,997
		z alelom T	70	100,5	
skupni testosteron [nmol/L]	zdrave	brez alela T	97	71,0	0,840
		z alelom T	43	69,5	
skupni testosteron [nmol/L]	bolnice s PCOS	brez alela T	146	114,9	0,275
		z alelom T	76	105,0	
prosti testosteron [pmol/L]	zdrave	brez alela T	32	20,3	0,140
		z alelom T	11	26,8	
prosti testosteron [pmol/L]	bolnice s PCOS	brez alela T	57	48,7	0,319
		z alelom T	35	43,0	
androstendion [nmol/L]	zdrave	brez alela T	105	73,5	0,504
		z alelom T	44	78,6	
androstendion [nmol/L]	bolnice s PCOS	brez alela T	146	114,7	0,296
		z alelom T	76	105,3	
DHEAS [μmol/L]	zdrave	brez alela T	105	73,0	0,499
		z alelom T	43	78,2	
DHEAS [μmol/L]	bolnice s PCOS	brez alela T	146	114,1	0,401
		z alelom T	76	106,5	
trigliceridi [mmol/L]	zdrave	brez alela T	32	19,7	0,039**
		z alelom T	11	28,7	
trigliceridi [mmol/L]	bolnice s PCOS	brez alela T	57	46,3	0,739
		z alelom T	36	48,2	
celokup. holesterol [mmol/L]	zdrave	brez alela T	32	21,1	0,418
		z alelom T	11	24,6	
celokup. holesterol [mmol/L]	bolnice s PCOS	brez alela T	57	48,9	0,398
		z alelom T	36	44,0	
HDL-holesterol [mmol/L]	zdrave	brez alela T	32	22,0	1,000
		z alelom T	11	22,0	
HDL-holesterol [mmol/L]	bolnice s PCOS	brez alela T	57	50,5	0,116
		z alelom T	36	41,5	
LDL-holesterol [mmol/L]	zdrave	brez alela T	32	21,5	0,675
		z alelom T	11	23,4	
LDL-holesterol [mmol/L]	bolnice s PCOS	brez alela T	57	48,5	0,497
		z alelom T	36	44,6	
skupni testosteron [nmol/L]	bolnice s PCOS brez IR	brez alela T	96	77,8	0,054*
		z alelom T	49	63,6	
inzulin na tešče [mU/L]	bolnice s PCOS in IR	brez alela T	49	34,8	0,046**
		z alelom T	27	45,3	

HOMA	bolnice s PCOS in IR	brez alela T	49	34,5	0,032**
		z alelom T	27	45,8	

* mejno značilna signifikanca

** značilna signifikanca

Naše ugotovitve smo primerjali z drugimi raziskavami:

S statistično obdelavo podatkov smo pri bolnicah s PCOS določili nakazano povezavo polimorfizma SNP1 z BMI, pri zdravih preiskovankah pa smo določili povezavo z LDL-holesterolom. Poleg tega smo pri bolnicah s PCOS za inzulin na tešče, indeks HOMA, SHBG in DHEAS pri primerjavi dveh skupin genotipov določili mejno značilne razlike. V splošnem lahko rečemo, da je heterozigotni genotip polimorfizma SNP1 manj ugoden.

Suviolahti in sod. so v vzorcu 92 finskih dislipidemičnih družin določili povezavo polimorfizma SNP1 z nivojem inzulina na tešče. Ko so moške in ženske analizirali ločeno, so ugotovili, da primarno moški prispevajo k tej povezavi. Povezave polimorfizma SNP1 z BMI, glukozo in trigliceridi na tešče v tej skupini preiskovancev niso našli. S podrobnejšo analizo so ugotovili, da se alel T polimorfizma SNP1 v večji meri deduje med osebami s povišanimi vrednostmi inzulina na tešče (69). To ugotovitev težko primerjamo z našimi, saj smo mi obravnavali posamezne genotipe (CC, CT, TT). V našem primeru več alelov T pomeni nižji inzulin na tešče in s tem ugodnejši genotip. Po drugi strani pa ti izsledki našim nasprotujejo, saj smo mi za razliko od njih določili nakazano povezavo SNP1 z inzulinom na tešče pri ženskah.

Suviolahti in sod. so analizirali tudi povezavo SNP v genu za lipin 1 z debelostjo pri suhih (BMI=20-25kg/m²) in debelih (BMI>30kg/m²) finskih posameznikih. Med drugim so določili povezanost polimorfizma SNP1 z BMI pri debelih moških. Ker povezave niso opazili pri suhih ali debelih ženskah, so zaključili, da je povezava alelov gena za lipin 1 z BMI spolno specifična (69). Ti rezultati našim nasprotujejo, saj smo mi pri ženskah določili nakazano povezavo polimorfizma SNP1 z BMI.

Določili smo povezavo alela T polimorfizma SNP17 z višjimi vrednostmi trigliceridov pri zdravih preiskovankah, nakazano povezavo z nižjimi vrednostmi skupnega testosterona pri bolnicah s PCOS brez IR in povezavo z višjimi vrednostmi inzulina na tešče in indeksa HOMA pri bolnicah s PCOS in IR. Po naših podatkih polimorfizem SNP17 pri bolnicah s PCOS in IR pomeni slabšo občutljivost tkiv na inzulin, pri zdravih preiskovankah pa večjo možnost pojava srčno-žilnih obolenj. Pri bolnicah s PCOS brez IR polimorfizem SNP17 predstavlja trend k manjšemu hiperandrogenizmu in je tako pri teh osebah ugodnejši.

Suviolahti in sod. niso v vzorcu finskih dislipidemičnih družin našli nobene povezave polimorfizma SNP17 s katerim od preučevanih kliničnih kazalcev (BMI, trigliceridi, glukosa in inzulin na tešče). Določili pa so povezavo polimorfizma SNP17 z BMI pri suhih moških v

skupini suhih (BMI=20-25kg/m²) in debelih (BMI>30kg/m²) finskih posameznikov. Pri ženskah povezave polimorfizma SNP17 z BMI niso opazili (69), kar se sklada z izsledki naše raziskave.

Wiedmann in sod. so na nemški populaciji iz območja Augsburga preučevali povezavo 15 SNP regije gena za lipin 1 z značilnostmi metabolnega sindroma. Ti preučevani polimorfizmi so bili: rs6748533, rs11676410, rs6707885, rs893346, rs6726960, C_25965595_10, rs1469952, rs33997857, rs6744682, rs6708316, rs2716610, rs1050800, rs2577256, rs953071 in rs1036668. Podčrtani polimorfizem rs2716610 (SNP17) smo preučevali tudi mi na naši populaciji. Wiedmann in sod. so obravnavali povezavo posameznih SNP z metabolnim sindromom in njegovimi parametri (sistolični tlak, diastolični tlak, BMI, obseg pasu, pogostost diabetesa, hemoglobin A1c, HDL-holesterol, trigliceridi) in jo določili med določenimi SNP in krvnim tlakom ter nivojem HDL-holesterola pri moških. Pri ženskah so bile te povezave manj izrazite (84).

Nemški raziskovalci so analizirali tri identične SNP kot Suviolahti in sod. (rs893346, rs2716610 in rs1050800). Noben od teh SNP (med njimi je tudi naš SNP17) ni pokazal zanesljive povezave s katerim od fenotipov, obravnavanih v tej nemški raziskavi (84). Wiedmann in sod. za svoje preiskovance na žalost niso imeli na voljo podatkov o inzulinu na tešče, s katerim smo na naši populaciji določili povezavo za polimorfizem SNP17.

4.2.4 Ugotavljanje vpliva diplotipov na klinične in biokemične kazalce IR in PCOS

S pomočjo programa EMLD (85) smo izračunali stopnjo vezavnega neravnovesja (D'). Vezavno neravnovesje opisuje pojav, pri katerem se kombinacija alelov ali genetskih markerjev v populaciji pojavlja bolj ali manj pogosto, kakor bi to pričakovali iz njihovih alelnih frekvenc (86). Čim bolj se D' približuje vrednosti 1, večja je stopnja vezavnega neravnovesja.

Naša dva polimorfizma SNP1 in SNP17 sta v nizkem vezavnem neravnovesju ($D' = 0,1563$), kar smo zaradi njune precejšnje oddaljenosti na kromosomu (~ 70 000 bp) tudi pričakovali.

V program PHASE v2.1.1 smo vnesli genotipe za vse vzorce, program pa nam je podal diplotipe in izračunal haplotipske frekvence. Haplotipe in diplotipe smo poimenovali v zaporedju SNP1-SNP17. Od 10 teoretično možnih diplotipov je program našim preiskovankam pripisal 9 različnih diplotipov. Za potrebe statistične analize smo 3 skupine diplotipov z najmanjšo frekvenco pridružili ostalim skupinam diplotipov po analognem načelu, kot smo pri polimorfizmu SNP17 združili genotipa C/T in T/T v genotip X/T. Tako smo diplotip T-T/T-T združili z diplotipom T-C/T-T, diplotip T-T/C-T z diplotipom T-T/C-C in diplotip C-T/C-T z diplotipom C-C/C-T. Nadalje smo imeli torej 6 diplotipov: T-C/T-C, T-X/T-T, T-C/C-C, T-T/C-X, C-C/C-C in C-X/C-T. S statističnim testom χ^2 smo ugotovili, da se frekvence diplotipov med skupinama bolnic s PCOS in zdravih preiskovank značilno ne razlikujejo. Opazili smo, da so diplotipi kakor tudi

haplotipi v naši populaciji dokaj razpršeno porazdeljeni, kar se sklada z nizko stopnjo vezavnega neravnovesja. Preglednica XVII prikazuje haplotipske in diplotipske frekvence v naši populaciji.

Preglednica XVII: Haplotipske frekvence in opaženi diplotipi.

haplotip	frekvenca	diplotip	N
C-C	54,0%	C-C/C-C	112 (30,2%)
T-C	28,3%	T-C/C-C	111 (29,9%)
C-T	10,4%	T-T/C-C	50 (13,5%)
T-T	7,3%	C-C/C-T	40 (10,8%)
D' = 0,1563		T-C/T-C	28 (7,5%)
		T-C/T-T	18 (4,9%)
		T-T/C-T	5 (1,3%)
		C-T/C-T	4 (1,1%)
		T-T/T-T	3 (0,8%)

Vpliv diplotipov smo testirali na vse predhodno obravnavane spremenljivke ob tem, da smo bolnice s PCOS in zdrave preiskovanke obravnavali skupaj. Vse klinične kazalce smo analizirali z neparametričnimi statističnimi testi.

Da bi ugotovili vpliv diplotipov, smo postavili ničelno in alternativno hipotezo:

→ H_0 : Diplotip ne vpliva na vrednost kliničnega kazalca.

→ H_1 : Diplotip vpliva na vrednost kliničnega kazalca.

Najprej smo s testom po Kruskal-Wallis ugotavljali, ali obstajajo razlike med 6 diplotipi v vrednosti posameznih kliničnih kazalcev (Preglednica XVIII). Za LDL-holesterol smo določili mejno signifikantno vrednost $p = 0,073$; tako je razlika med diplotipi le nakazana. V nadaljevanju smo inzulin na tešče, glukozo na tešče in LDL-holesterol analizirali še z Mann-Whitneyevim testom, tako da smo primerjali diplotipa z največjo razliko srednjih rangov (Preglednica XIX). Za ostale klinične kazalce (HOMA, BMI, SHBG, skupni testosteron, prosti testosteron, androstendion, DHEAS, trigliceridi, celokupni holesterol in HDL-holesterol) smo sprejeli ničelno hipotezo, ki pravi, da diplotip ne vpliva na vrednost teh kliničnih kazalcev pri izbrani stopnji tveganja $\alpha = 0,05$.

Z Mann-Whitneyevim testom smo za vse tri preučevane klinične kazalce določili verjetnost $p < 0,05$, kar pomeni, da se primerjani diplotipi značilno razlikujejo. Nosilke diplotipa T-X/T-T imajo značilno nižje vrednosti inzulina na tešče in LDL-holesterola v serumu v primerjavi z nosilkami diplotipa T-T/C-X (Preglednica XX, Slika 22 in Slika 24). Prav tako imajo nosilke diplotipa T-C/T-C značilno nižje vrednosti glukoze na tešče kot nosilke diplotipa T-C/C-C (Preglednica XX,

Slika 23). Zaključimo lahko, da sta diplotipa, ki sta homozigotna za mutirano obliko polimorfizma SNP1, ugodnejša v primerjavi z diplotipoma, ki sta heterozigotna za ta polimorfizem, saj pomenita večjo občutljivost tkiv na inzulin, manj motenj glukoze homeostaze in manjšo možnost pojava srčno-žilnih obolenj. Te ugotovitve se skladajo z izsledki analize posameznih polimorfizmov, kjer je bil pri inzulinu na tešče in LDL-holesterolu genotip TT polimorfizma SNP1 prav tako ugodnejši.

Preglednica XVIII: Rezultati testa po Kruskal-Wallis o vplivu diplotipov na klinične kazalce.

Test po Kruskal-Wallis	
klinični kazalec	p
inzulin na tešče	0,170
glukoza na tešče	0,164
HOMA	0,266
BMI	0,554
SHBG	0,430
skupni testosteron	0,745
prosti testosteron	0,882
androstendion	0,970
DHEAS	0,555
trigliceridi	0,262
celokup. holesterol	0,224
HDL-holesterol	0,664
LDL-holesterol	0,073*

* mejno značilna signifikanca

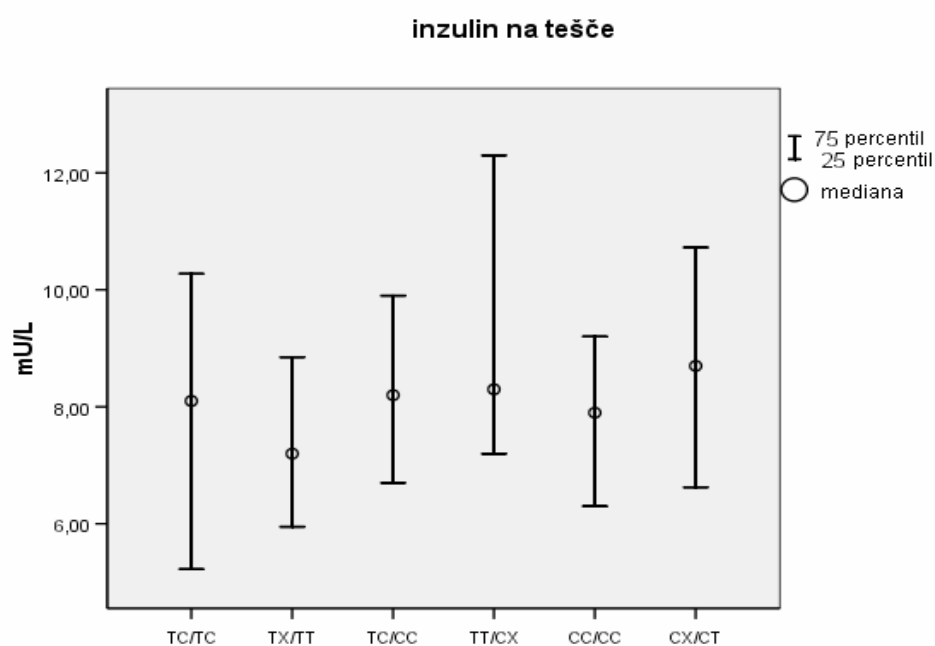
Preglednica XIX: Rezultati primerjave posameznih diplotipov z Mann-Whitneyevim testom za inzulin na tešče, glukozo na tešče in LDL-holesterol.

Mann-Whitneyev test				
klinični kazalec	primerjani diplotipi	N	srednji rangi	p
inzulin na tešče	T-X/T-T : T-T/C-X	21 : 55	30,0 : 41,7	0,039**
glukoza na tešče	T-C/T-C : T-C/C-C	28 : 111	55,1 : 73,8	0,028**
LDL-holesterol	T-X/T-T : T-T/C-X	9 : 23	10,4 : 18,9	0,021**

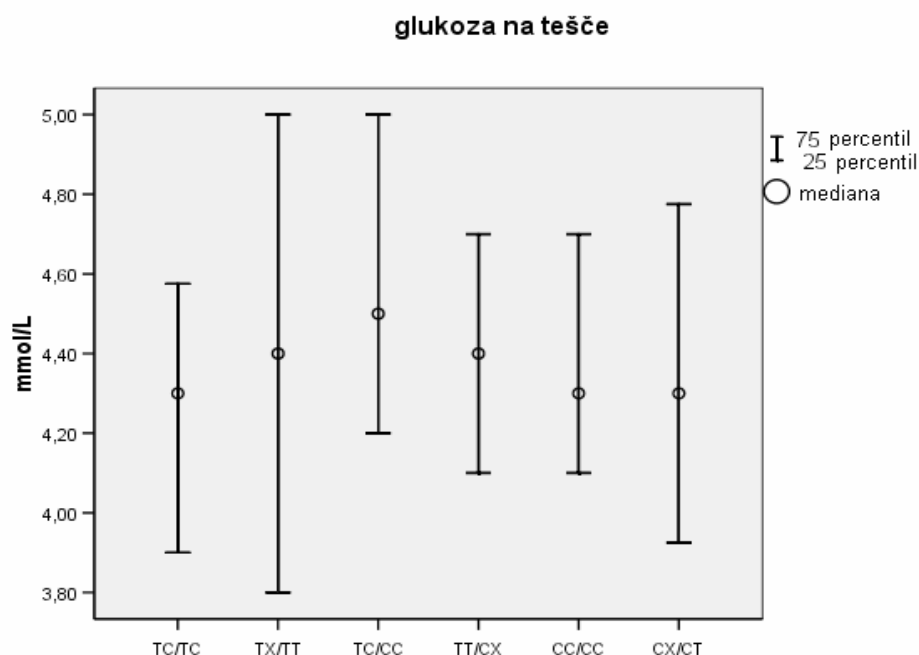
**** značilna signifikanca**

Preglednica XX: Mediane in zgornji/spodnji kvartili za inzulin na tešče, glukozo na tešče ter LDL-holesterol.

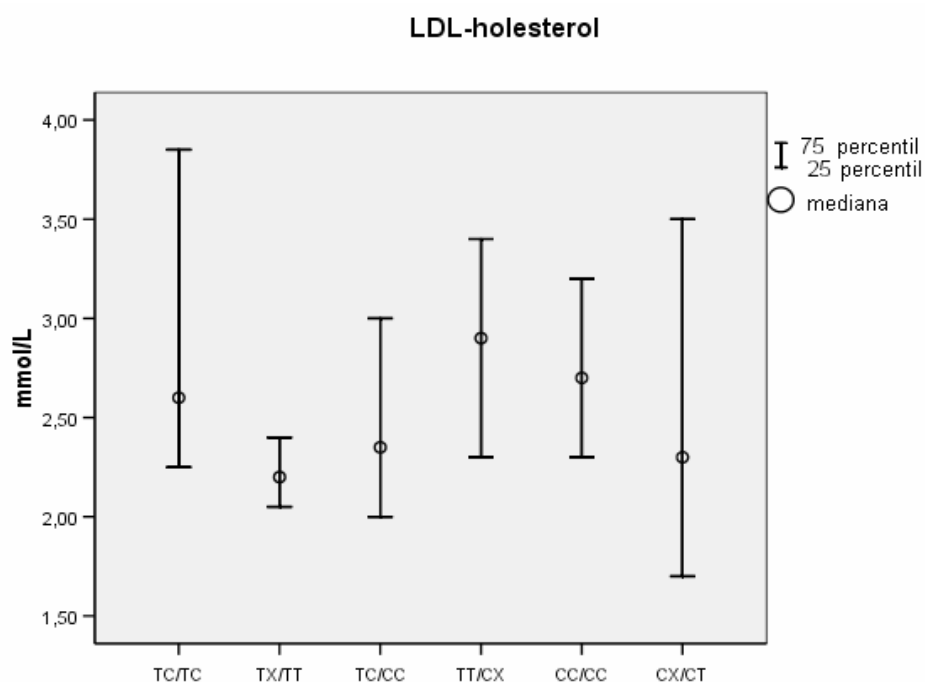
diplotip	inzulin na tešče (mU/L)			glukoza na tešče (mmol/L)			LDL-holesterol (mmol/L)		
	mediana	zgornji/spodnji kvartil	N	mediana	zgornji/spodnji kvartil	N	mediana	zgornji/spodnji kvartil	N
T-C/T-C	8,10	5,23/10,28	28	4,30	3,90/4,58	28	2,60	2,25/3,85	9
T-X/T-T	7,20	5,95/8,85	21	4,40	3,80/5,00	21	2,20	2,05/2,40	9
T-C/C-C	8,20	6,70/9,90	111	4,50	4,20/5,00	111	2,35	2,00/3,00	42
T-T/C-X	8,30	7,20/12,30	55	4,40	4,10/4,70	55	2,90	2,30/3,40	23
C-C/C-C	7,90	6,30/9,20	111	4,30	4,10/4,70	112	2,70	2,30/3,20	38
C-X/C-T	8,70	6,63/10,73	44	4,30	3,93/4,78	44	2,30	1,70/3,50	15



Slika 22: Mediane inznulina na tešče glede na diplotip.



Slika 23: Mediane glukoze na tešče glede na diplotip.



Slika 24: Mediane LDL-holesterola glede na diplotip.

Naše ugotovitve smo primerjali z drugimi študijami:

Suviolahti in sod. so preučevali povezavo specifičnih alelov gena za lipin 1 z metabolnimi značilnostmi pri ljudeh. V vzorcu finskih dislipidemičnih družin so analizirali sedem SNP (SNP1 (rs893346), SNP2 (rs11693809), SNP3 (rs10192566), SNP4 (rs2278513), SNP5 (rs2577262), SNP6 (rs2716610) in SNP7 (rs1050800)) in določili stopnjo vezavnega neravnovesja (D') za

posamezen par polimorfizmov. Za naša dva polimorfizma SNP1 in SNP17, ki sta podčrtana, so določili $D' = 0.19$, kar je podobna vrednost, kot smo jo mi izračunali na naši populaciji ($D' = 0.16$). SNP 2–4, ki se nahajajo na odseku dolgem 28000 baznih parov med eksonom 1 in eksonom 6 v genu za lipin 1, so bili v visokem vezavnem neravnovesju ($D' > 0.9$).

Raziskovalci so v vzorcu finskih dislipidemičnih družin analizirali tudi deset različnih haplotipov s frekvencami $\geq 4\%$, ki jih tvorijo SNP 1–7. Analiza haplotipov je pokazala povezavo z inzulinom na tešče pri moških, medtem ko povezave z BMI, trigliceridi in glukozo na tešče niso opazili. Podrobnejša analiza je pokazala, da se najpogostejši haplotip, haplotip 1 (SNP1-2-3-4-5-6-7, A-T-C-T-G-C-C) s frekvenco 20%, in haplotip 10 (A-T-C-T-G-T-C) s frekvenco 4% v večji meri dedujeta med posamezniki s povišano vrednostjo inzulina na tešče. Obratno se je haplotip 8 (A-T-C-T-A-C-T) s frekvenco 5% v manjši meri dedoval med osebami z višjimi vrednostmi inzulina na tešče. Po permutaciji je povezava z nivojem inzulina na tešče ostala signifikantna pri moških za haplotip 1 (A-T-C-T-G-C-C), haplotip 8 (A-T-C-T-A-C-T) in haplotip 10 (A-T-C-T-G-T-C) (69).

Naše rezultate bi težko primerjali z izsledki analize haplotipov pri Suviolahti in sod. (69), saj so oni obravnavali širši nabor polimorfizmov. Morda je zanimivo, da so pri tej finski raziskavi določili povezavo z inzulinom na tešče za naš SNP1 in za haplotipe zgolj pri moških, medtem ko smo mi povezavo s tem kliničnim kazalcem za oba obravnavana polimorfizma kakor tudi pri analizi diplotipov zaznali na ženski populaciji.

Na osnovi analize vezavnega neravnovesja so Wiedmann in sod. v genu za lipin 1 identificirali tri haplobloke. Haplotipski blok so definirali kot regijo, kjer so vse stopnje vezavnega neravnovesja (D') za posamezen par polimorfizmov >0.8 . Haploblok 1 (rs6726960, C_25965595_10, rs1469952) se nahaja med intronom 1 in intronom 5 ter tvori štiri haplotipe s frekvencami $\geq 2.0\%$. Haploblok 2 (rs33997857, rs6744682, rs6708316) se nahaja med eksonom 10 in intronom 13 ter tvori štiri haplotipe s frekvencami $\geq 4\%$. Haploblok 3, ki vsebuje tudi naš polimorfizem SNP17 (rs2716610, rs1050800), pa se razteza med intronom 17 in UTR3' ter tvori dva haplotipa. Ker v študijo haplotipov niso vključili polimorfizma rs11693809 (SNP1), primerjava naših rezultatov z njihovimi ni najbolj ustrezna.

Wiedmann in sod. so določili močno signifikantno povezavo med faktorjem metabolnega sindroma, BMI, obsegom pasu in krvnim tlakom ter alelnimi kombinacijami haplobloka 2. V nadaljevanju so podrobneje analizirali vsako alelno različico tega haplobloka. Ugotovili so, da haplotip 122 s frekvenco 26,8% poveča tveganje za razvoj metabolnega sindroma, medtem ko sta druga dva manj pogosta haplotipa (121 s frekvenco 4,0% in 112 s frekvenco 5,7%) močno povezana z nižjim krvnim tlakom, manjšim BMI, obsegom pasu, nižjimi vrednostmi hemoglobina A1c kakor tudi z nižjim faktorjem metabolnega sindroma. Poleg tega je pri osebah, ki so nosilci enega od teh dveh zaščitnih haplotipov, signifikantno manjša pogostost arterijske

hipertenzije, debelosti, diabetesa in prisotnosti \geq treh komponent metabolnega sindroma. Na neodvisnem ponovitvenem vzorcu, ki je zajemal preiskovance iz cele Nemčije in iste haplotipe, so prav tako opazili močne povezave, vendar z učinki v nasprotni smeri (84).

Če primerjamo finsko (69), nemško (84) in našo raziskavo, se polimorfizem SNP17 (rs2716610), ki je bil pri Suviolahti in sod. povezan z BMI, nahaja v neposredni 3'-bližini haplobloka 2, ki je pri Wiedmann in sod. prav tako povezan z BMI. Ta enakost je verjetno posledica visokega vezavnega neravnovesja, v katerem so ti SNP (84). V naši populaciji, kot že rečeno, nismo opazili povezave polimorfizma SNP17 z BMI.

Oba naša polimorfizma SNP1 in SNP17 se nahajata v intronih, kar pomeni, da ne vplivata na aminokislinsko zgradbo proteina lipina 1.

Za introne je že nekaj časa znano, da pospešujejo evolucijo novih genov preko spremembe položaja ali podvojitve eksonov. Poleg tega alternativno izrezovanje intronov omogoča nastanek večih različnih proteinov iz enega samega gena. Novejša dognanja govorijo o intronih kot o pomembnih regulatorjih ekspresije genov; mnoge študije so pokazale, da so konstitutivno izrezani introni potrebni za optimalno ekspresijo genov. Jasno postaja, da lahko introni in njihova odstranitev s pomočjo spliceosoma vplivajo na različne stopnje metabolizma mRNA: transkripcijo, poliadenilacijo, transport mRNA iz jedra, translacijo in na hitrost razkroja mRNA. Tako imajo lahko sicer identični geni, a z introni oziroma brez njih, precej različne profile ekspresije (87, 88).

Izsledke naše raziskave bi bilo zanimivo primerjati z rezultati analize ekspresije gena za lipin 1 na naši populaciji; tako bi dobili podrobnejši pogled na vpliv polimorfizmov SNP1 in SNP17 na protein lipin 1.

5 SKLEPI

V naši raziskavi na skupini 371 preiskovank smo ugotovili, da:

- * genotipske frekvence za polimorfizem SNP1 (rs11693809) znašajo: C/C : C/T : T/T = 42,1% (156) : 44,7% (166) : 13,2% (49).
- * genotipske frekvence za polimorfizem SNP17 (rs2716610) znašajo: C/C : C/T : T/T = 67,7% (251) : 29,1% (108) : 3,2% (12).
- * so genotipske frekvence bolnic in zdravih preiskovank za posamezen polimorfizem v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.
- * se genotipske in alelne frekvence za posamezen polimorfizem med bolnicami s PCOS in zdravimi preiskovankami značilno ne razlikujejo. Nakazano značilna razlika je bila opažena med bolnicami s PCOS in IR ter zdravimi preiskovankami brez PCOS in IR za polimorfizem SNP1.
- * je polimorfizem SNP1 pri bolnicah s PCOS nakazano povezan z BMI; pri zdravih preiskovankah pa je značilno povezan z LDL-holesterolom. Mejno značilna razlika je pri bolnicah s PCOS prisotna v vrednosti inzulina na tešče, indeksa HOMA, SHBG in DHEAS v serumu med posameznima skupinama genotipov. Heterozigotni genotip C/T polimorfizma SNP1 je pri bolnicah s PCOS tako manj ugoden, saj pomeni slabšo občutljivost tkiv na inzulin in večjo hiperandrogenizacijo tkiv.
- * je polimorfizem SNP17 značilno povezan z inzulinom na tešče ter indeksom HOMA pri bolnicah s PCOS in IR; značilno je tudi povezan s trigliceridi v serumu pri zdravih preiskovankah. Bolnice s PCOS in IR ter zdrave preiskovanke z alelom T imajo metabolično manj ugoden fenotip. Polimorfizem SNP17 je nakazano povezan tudi s koncentracijo skupnega testosterona v serumu pri bolnicah s PCOS brez IR, a v nasprotno smer kot z metaboličnimi kazalci.
- * sta polimorfizma SNP1 in SNP17 v nizkem vezavnem neravnovesju ($D' = 0,1563$).
- * imata diplotipa, ki sta homozigotna za mutirano obliko polimorfizma SNP1, značilno nižje vrednosti inzulina na tešče in LDL-holesterola oziroma glukoze na tešče v primerjavi z diplotipoma, ki sta heterozigotna za ta polimorfizem, in torej predstavljata manjše tveganje za nastanek motenj glukozne homeostaze ter bolezni srca in ožilja.

Na osnovi naših rezultatov smo zaključili, da je možna povezava med obravnavanima polimorfizmoma v genu za lipin 1 in razvojem IR ter PCOS. Glede na dokazan vpliv gena za lipin 1 na metabolne značilnosti pri ljudeh je smiselno nadaljnje preučevanje polimorfizmov v tem genu.

6 LITERATURA

1. Wilcox G: Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005;26:19-39
2. Saltiel AR, Kahn CR: Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414:799-806
3. Voet D, Voet JG: *Biochemistry*. 3rd. Ed. John Wiley & sons, Inc., Hoboken, 2004:718-720
4. http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6865/fig_tab/414799a_F2.html
5. Bresjanac M, Ribarič S...et al.: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9. izdaja. Medicinska fakulteta v Ljubljani, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2001:143, 145
6. Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M: Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta.* 2007;375(1-2):20-35
7. Straczkowski M, Stepień A, Kowalska I, Kinalska I: Comparison of simple indices of insulin sensitivity using the euglycemic hyperinsulinemic clamp technique. *Med Sci Monit.* 2004;10(8):CR480-4
8. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR: Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care.* 2004;27(6):1487-95
9. Ruan H, Lodish HF: Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(5):447-55
10. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB: The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest.* 1995;95(5):2111-9
11. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ: The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005;365(9468):1415-28
12. Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF: Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes.* 2002;51(11):3176-88
13. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L: Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest.* 1994;93(6):2438-46
14. Jenkins AB, Campbell LV: The genetics and pathophysiology of diabetes mellitus type II. *J Inherit Metab Dis.* 2004;27(3):331-47
15. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Björkman O, Olsson M, Wahren J: Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1985;76(1):149-55
16. Sharma AM, Chetty VT: Obesity, hypertension and insulin resistance. *Acta Diabetol.* 2005;42 Suppl 1:S3-8

17. Ruan H, Hacothen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF: Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes*. 2002;51(5):1319-36
18. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR: Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*. 2003;26(8):2442-50
19. Kinlaw WB, Marsh B: Adiponectin and HIV-lipodystrophy: taking HAART. *Endocrinology*. 2004;145(2):484-6
20. Kershaw EE, Flier JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548-56
21. Meier U, Gressner AM: Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*. 2004;50(9):1511-25
22. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest*. 2001;108(12):1875-81
23. Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI, Gorden P, Garg A: Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med*. 2002;346(8):570-8
24. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7(8):941-6
25. Webber J: Energy balance in obesity. *Proc Nutr Soc*. 2003;62(2):539-43
26. Bjørbaek C, Kahn BB: Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:305-31
27. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307-12
28. Banerjee RR, Lazar MA: Resistin: molecular history and prognosis. *J Mol Med*. 2003;81(4):218-26
29. Utzschneider KM, Carr DB, Tong J, et al: Resistin is not associated with insulin sensitivity or the metabolic syndrome in humans. *Diabetologia*. 2005;48(11):2330-3
30. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA: Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem*. 2003;278(16):13740-6
31. Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E: Modulation of insulin action. *Diabetologia*. 2004;47(2):170-84

32. Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ: The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(5):235-41
33. Sheehan MT: Polycystic ovarian syndrome: diagnosis and management. *Clin Med Res.* 2004;2(1):13-27
34. Norman RJ, Wu R, Stankiewicz MT: 4: Polycystic ovary syndrome. *Med J Aust.* 2004;180(3):132-7
35. Lobo RA, Carmina E: The importance of diagnosing the polycystic ovary syndrome. *Ann Intern Med.* 2000;132(12):989-93
36. Guzick DS: Polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol.* 2004;103:181–93
37. Rajkhowa M, Neary RH, Kumpatla P, Game FL, Jones PW, Obhrai MS, Clayton RN: Altered composition of high density lipoproteins in women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(10):3389-94
38. Hardiman P, Pillay OC, Atiomo W: Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *Lancet.* 2003;361(9371):1810-2
39. Vignesh JP, Mohan V: Polycystic ovary syndrome: a component of metabolic syndrome? *J Postgrad Med.* 2007;53(2):128-34
40. Zawadzki J, Dunaif A 1992 Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome:towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens, J, Haseltine F, Merriam, Geds. *Polycystic ovary syndrome.* Boston: Blackwell Scientific Publications; 377–384
41. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;81:19–25
42. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M: The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 2005;26(2):251-282
43. www.stjohn.org/.../swArticle.aspx?3,83021
44. Lobo RA, Granger LR, Paul WL, Goebelsmann U, Mishell DR Jr: Psychological stress and increases in urinary norepinephrine metabolites, platelet serotonin, and adrenal androgens in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1983;145(4):496-503
45. Unger JW, Livingston JN, Moss AM: Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog Neurobiol.* 1991;36(5):343-62
46. Nestler JE: Role of hyperinsulinemia in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome, and its clinical implications. *Semin Reprod Endocrinol.* 1997;15(2):111-22
47. Munir I, Yen HW, Geller DH, Torbati D, Bierden RM, Weitsman SR, Agarwal SK, Magoffin DA: Insulin augmentation of 17alpha-hydroxylase activity is mediated by phosphatidyl inositol 3-kinase but not extracellular signal-regulated kinase-1/2 in human ovarian theca cells. *Endocrinology.* 2004;145(1):175-83

48. Book CB, Dunaif A: Selective insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(9):3110-6
49. Nestler JE, Jakubowicz DJ, de Vargas AF, Brik C, Quintero N, Medina F: Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(6):2001-5
50. Zhang LH, Rodriguez H, Ohno S, Miller WL: Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(23):10619-23
51. Ben-Shlomo I: The polycystic ovary syndrome: what does insulin resistance have to do with it? *Reprod Biomed Online.* 2003;6(1):36-42
52. Legro RS, Driscoll D, Strauss JF 3rd, Fox J, Dunaif A: Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(25):14956-60
53. Doi SA, Towers PA, Scott CJ, Al-Shoumer KA: PCOS: an ovarian disorder that leads to dysregulation in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;118(1):4-16
54. Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, Lawrence JC Jr, Kelly DP: Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab.* 2006;4(3):199-210
55. Péterfy M, Phan J, Xu P, Reue K: Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet.* 2001;27(1):121-4
56. Xu J, Lee WN, Phan J, Saad MF, Reue K, Kurland IJ: Lipin deficiency impairs diurnal metabolic fuel switching. *Diabetes.* 2006;55(12):3429-38
57. Harris TE, Huffman TA, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Kumar A, Lawrence JC Jr: Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1. *J Biol Chem.* 2007;282(1):277-86
58. Donkor J, Sariahmetoglu M, Dewald J, Brindley DN, Reue K: Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J Biol Chem.* 2007;282(6):3450-7
59. Carman GM, Han GS: Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(12):694-9
60. Phan J, Reue K: Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab.* 2005;1(1):73-83
61. Cao H, Hegele RA: Identification of single-nucleotide polymorphisms in the human LPIN1 gene. *J Hum Genet.* 2002;47(7):370-2

62. Phan J, Péterfy M, Reue K: Lipin expression preceding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is critical for adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 2004;279(28):29558-64
63. Phan J, Peterfy M, Reue K: Biphasic expression of lipin suggests dual roles in adipocyte development. *Drug News Perspect.* 2005;18(1):5-11
64. Huffman TA, Mothe-Satney I, Lawrence JC Jr: Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(2):1047-52
65. van Harmelen V, Rydén M, Sjölin E, Hoffstedt J: A role of lipin in human obesity and insulin resistance: relation to adipocyte glucose transport and GLUT4 expression. *J Lipid Res.* 2007;48(1):201-6
66. Péterfy M, Phan J, Reue K: Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis. *J Biol Chem.* 2005;280(38):32883-9
67. Croce MA, Eagon JC, LaRiviere LL, Korenblat KM, Klein S, Finck BN: Hepatic lipin 1beta expression is diminished in insulin-resistant obese subjects and is reactivated by marked weight loss. *Diabetes.* 2007;56(9):2395-9
68. Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Miles LM, Phanavanh B, Starks TN, Phan J, Spencer HJ 3rd, McGehee RE Jr, Reue K, Kern PA: Lipin expression is attenuated in adipose tissue of insulin-resistant human subjects and increases with peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *Diabetes.* 2006;55(10):2811-8
69. Suviolahti E, Reue K, Cantor RM, Phan J, Gentile M, Naukkarinen J, Soro-Paavonen A, Oksanen L, Kaprio J, Rissanen A, Salomaa V, Kontula K, Taskinen MR, Pajukanta P, Peltonen L: Cross-species analyses implicate Lipin 1 involvement in human glucose metabolism. *Hum Mol Genet.* 2006;15(3):377-86
70. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=2716610
71. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=11693809
72. den Dunnen JT, Antonarakis SE: Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet.* 2001;109(1):121-4
73. Kuhelj R: Biokemija v praksi: načela in tehnike, 2.izdaja, Univerza v Ljubljani, FKKT, Ljubljana, 2001: 71-85
74. <http://www.nanodrop.com/>
75. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn.* 2004;55:215-220
76. www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html

77. Shi MM: Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin Chem.* 2001;47(2):164-72
78. TaqMan[®] SNP Genotyping Assays: Protocol. Applied Biosystems.2004
79. <http://en.wikipedia.org/wiki/TaqMan>
80. www.servicexs.com/dbres/?t=158
81. http://www.wi.mit.edu/CMT/protocols/TqMn_Univ_PCRMstrMx.pdf
82. www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls
83. Campbell N, Reece J: *Biology*, 6th Ed. Benjamin Cummings, 2002
84. Wiedmann S, Fischer M, Koehler M, Neureuther K, Riegger G, Doering A, Schunkert H, Hengstenberg C, Baessler A: Genetic variants within the LPIN1 gene, encoding lipin, are influencing phenotypes of the metabolic syndrome in humans. *Diabetes.* 2008;57(1):209-17
85. <https://cge.mandarson.org/~qhuang/software/pub.htm>
86. http://en.wikipedia.org/wiki/Linkage_disequilibrium
87. Nott A, Meislin SH, Moore MJ: A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA.* 2003;9(5):607-17
88. Le Hir H, Nott A, Moore MJ: How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(4):215-20