

Genetika sindroma policističnih jajčnikov - vloga mikrosatelitskega polimorfizma (TAAAA)_n v genu SHBG

Genetics of polycystic ovary syndrome - a role of microsatellite polymorphism (TAAAA)_n in the SHBG gene

Polonca Ferk, Teja Čelhar, Ksenija Geršak

Povzetek Sindrom policističnih jajčnikov (PCOS) je kompleksna bolezen, z izrazito heterogeno klinično sliko in verjetnim genetskim ozadjem. Hiperandrogenizem je ena od ključnih fenotipskih značilnosti PCOS. Med številnimi doslej predlaganimi kandidatnimi genetskimi polimorfizmi za PCOS je tudi mikrosatelitski polimorfizem (TAAAA)_n v promotorju gena *SHBG*. Gen *SHBG* nosi zapis za specifični vezavni globulin za spolne hormone (SHBG), kateri vpliva na delež biološko razpoložljivih androgenov, navedeni polimorfizem pa uravnava ekspresijo gena *SHBG*. V naši raziskavi na 118 bolnicah s PCOS in 108 zdravih prostovoljках smo ugotavljali morebitno povezavo polimorfizma (TAAAA)_n *SHBG* s serumskimi koncentracijami SHBG ter tako posredno s samim razvojem PCOS. Obe skupini preiskovank sta se značilno razlikovali po svojem biokemijskem in kliničnem profilu. Obravnavani polimorfizem se je izkazal za močan napovedni dejavnik serumskih koncentracij SHBG; daljši aleli so verjetno povezani z nižjimi serumskimi koncentracijami SHBG in s tem z večjim tveganjem za razvoj hiperandrogenizma pri PCOS. Polimorfizem (TAAAA)_n *SHBG* pa najbrž ni edini genetski dejavnik tveganja za razvoj celotnega spektra klinične slike PCOS, temveč gre verjetno za vpliv specifične kombinacije več različnih genetskih polimorfizmov v povezavi z nekaterimi dejavniki iz okolja.

Ključne besede: sindrom policističnih jajčnikov (PCOS), kandidatni geni za PCOS, polimorfizem (TAAAA)_n v genu *SHBG*

ABSTRACT: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex disease, with extremely heterogeneous clinical presentation and a possible genetic background. Hyperandrogenism is one of the key features in PCOS. Among numerous PCOS candidate genetic polymorphisms, the microsatellite polymorphism (TAAAA)_n in the promoter of the *SHBG* gene has also been proposed. The *SHBG* gene encodes for specific sex hormone binding globulin (SHBG), which influences the proportion of bioavailable androgens, and the polymorphism regulates the *SHBG* gene's expression. In the present study on 118 PCOS women and 108 healthy volunteers, possible associations of the (TAAAA)_n *SHBG* polymorphism with serum SHBG levels and with the development of PCOS were investigated. Both groups of patients differed significantly in their biochemical and clinical profiles. The polymorphism was ascertained to be a strong predictor for serum SHBG levels; longer alleles were associated with lower serum SHBG levels and thus with higher risks for hyperandrogenism in PCOS. Rather than the (TAAAA)_n *SHBG* polymorphism as the only genetic susceptibility factor, a specific combination of several genetic polymorphisms modified by environmental factors might be involved in the development of the whole spectrum of PCOS clinical picture.

Key words: polycystic ovary syndrome (PCOS), PCOS candidate genes, (TAAAA)_n *SHBG* polymorphism

1 Uvod

1.1 Klinična slika sindroma policističnih jajčnikov

Prva opredelitev sindroma policističnih jajčnikov (PCOS) sega v leto 1935, ko sta Stein in Leventhal opisala sočasno prisotnost morfološko policističnih jajčnikov (PCO) in amenoreje. Danes vemo, da se PCOS klinično ne odraža samo z motnjami v delovanju jajčnikov in s tem v reproduktivnem zdravju ženske, temveč da gre za kompleksno sistemsko bolezen, z izrazito heterogenim izražanjem (1).

Glede na najnovejše diagnostične kriterije (2) morata biti za postavitev diagnoze PCOS pri ženski izpolnjena (vsaj) dva od naslednjih treh kriterijev: (i) kronične oligoovulatorne ali anovulatorne motnje menstruacijskega ciklusa, ki se izražajo z oligomenorejo ali amenorejo, ter vodijo v zmanjšano plodnost oz. neplodnost; (ii) klinični hiperandrogenizem (čežmerna poraščenost po moškem tipu - t. i. hirsutizem, aknavost, plešavost po moškem tipu) in/ali patološko zvišane koncentracije androgenih hormonov v krvi (tj. biokemični hiperandrogenizem oz. hiperandrogenemija); (iii) PCO na ultrazvoku (3). Predhodno je potrebno izključiti druge možne etiologije:

hiperprolaktinemijo, Cushingov sindrom, neklasično kongenitalno adrenalno hiperplazijo, akromegalijo ter prisotnost tumorjev, ki prekomerno izločajo androgene.

Druge značilnosti klinične slike PCOS so tudi povišano razmerje serumskih koncentracij luteinizirajočega hormona (LH) in folikle stimulirajočega hormona (FSH) (razmerje > 2), presnovne motnje (inzulinska rezistenca, glukozna intoleranca, dislipidemije), debelost (zlasti trebušna) (4).

S prevalenco, ocenjeno na 5-10 % na različnih etničnih populacijah, je PCOS verjetno najpogostejša endokrina motnja pri ženskah v rodnem obdobju, medtem ko ima PCO (še) brez razvitih simptomov kar vsaka peta ženska v splošni populaciji. Poleg tega je PCOS vzrok za kar tri četrtine vseh primerov anovulatorne neplodnosti, pokriva pa tudi kar 90 % vseh vzrokov hirzutizma (1). Dolgoročne zdravstvene posledice bolnic s PCOS se odražajo predvsem z močno povečanim tveganjem za razvoj sladkorne bolezni tipa 2 (5) ter srčno-žilnih obolenj (6) v kasnejšem življenjskem obdobju.

1.2 Patogeneza PCOS

Na molekularnem nivoju so za PCOS značilne naslednje patofiziološke spremembe: (i) v biosintezi, metabolizmu in/ali delovanju androgenov, (ii) v izločanju in/ali delovanju inzulina, (iii) na

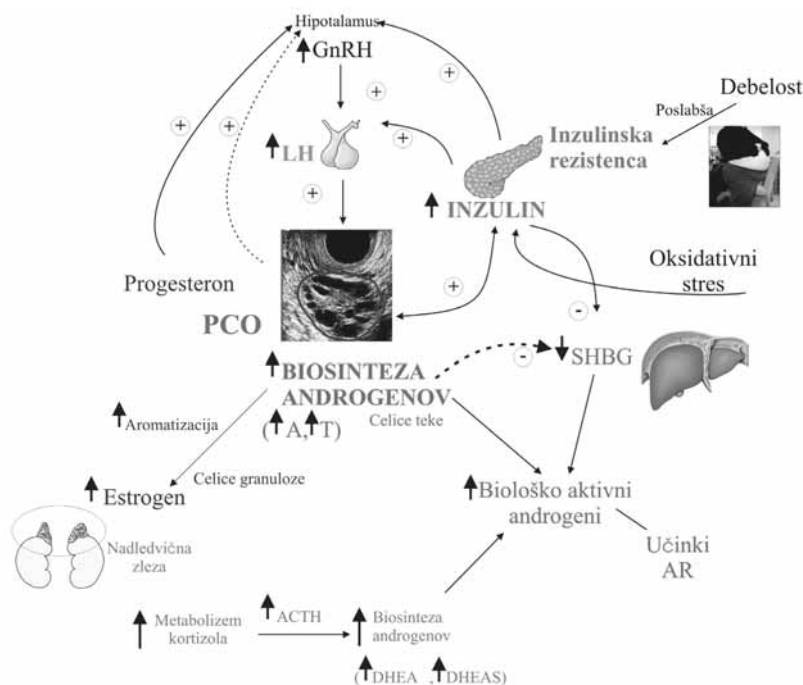
nivoju hipotalamično-hipofizne osi, (iv) v metabolizmu kortizola, (v) v metabolizmu lipidov, (vi) subklinični kronični vnetni procesi. Navedene biokemijske spremembe so medsebojno povezane (slika 1), izvor celotnega spektra motenj pa je najverjetneje v prekomerni biosintezi androgenov v jajčnikih (7).

Glede na ekstremno fenotipsko raznolikost in kompleksnost klinične slike PCOS je razvoj tega sindroma zelo verjetno posledica kompleksnega medsebojnega vpliva več različnih dejavnikov tveganja: genetskih dejavnikov (specifične genotipske kombinacije) in/ali dejavnikov okolja (način prehranjevanja, telesna dejavnost). Govorimo o multifaktorski patogenezi, ki pa kljub številnim raziskavam ostaja še vedno v veliki meri nepojasnjena (1).

1.3 Hiperandrogenizem pri PCOS

Na razvoj kliničnega hiperandrogenizma pri bolnicah s PCOS vplivajo: (i) hiperandrogenemija, (ii) povečan delež biološko razpoložljivih androgenov ter (iii) prekomerna odzivnost receptorja za androgene, zaradi česar so učinki androgenov lahko okrepljeni tudi v primeru njihovih normalnih krvnih koncentracij (1).

Hiperandrogenemija je pri bolnicah s PCOS v največji meri posledica prekomerne biosinteze androgenov v jajčnikih, delno pa tudi v nadledvični žlezi. Glede na to, da celice teke iz PCO ohranijo v



Slika 1: Patogeneza sindroma policističnih jajčnikov: A-androstendion; ACTH-adrenokortikotropni hormon; AR-androgeni receptor; DHEA-dehidroepiandrosteron; DHEAS-dehidroepiandrosteron sulfat; GnRH-sprostitutveni hormon za gonadotropine; LH-luteinizirajoči hormon; PCO-policistični jajčniki; SHBG-vezavni globulin za spolne hormone; T-testosteron; ↑-povišan, povečan; ↓-znižan, zmanjšan; črtkana črta-šibek učinek; znak + se nanaša na pozitiven, spodbujajoč učinek, znak - pa na negativen, zaviralni učinek.

Figure 1: Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: A-androstendione; ACTH-adrenocorticotropic hormone; AR-androgen receptor; DHEA-dehydroepiandrosterone; DHEAS-dehydroepiandrosterone sulfate; GnRH-gonadotropin-releasing hormone; LH-luteinizing hormone; PCO-polycystic ovaries; SHBG-sex hormone-binding globulin; T-testosterone; ↑-increased; ↓-decreased; broken line indicates weak influence; + indicates stimulatory effect; - indicates inhibitory effect.

pogojih *in vitro* stabilen biokemijski in molekularni fenotip (8), lahko gre za intrinzično motnjo na kateri od stopenj v procesu steroidogeneze. Nadalje je znano, da ima LH, katerega frekvenca in amplituda izločanja sta pri bolnicah s PCOS povečani, izrazito stimulirajoči učinek na biosintezo androgenov v jajčnikih. Steroidogenezo spodbuja tudi inzulin (ter inzulinu podobni rastni dejavniki), katerega koncentracije v krvi so pri ženskah s PCOS pogosto povišane. Učinek inzulina je neposreden ali preko okrepitev učinkov LH. Dodatni prispevek hiperinzulinemije h kliničnemu hiperandrogenizmu je tudi preko zaviranja biosinteze vezavnega globulina za spolne hormone (SHBG) v jetrih, kar posledično vodi do višjih koncentracij prostih androgenov v krvi. Presežek androgenov v lokalnem okolju jajčnikov prizadene dozorevanje jajčnih foliklov, kar pripelje do anovulacije. Krog biokemijskih sprememb se sklone, ko hiperandrogenija povratno spodbudi izločanje gonadotropinov iz hipofize (*slika 1*) (1).

Glede na najnovejšo predpostavko naj bi se hiperandrogeni fenotip za PCOS programiral že v predrojstnem obdobju, in sicer v primeru izpostavljenosti ploda presežku androgenov kot posledice lastnih (genetskih) dejavnikov tveganja in ne kot posledice metabolnih sprememb pri materi (9).

1.4 Genetika PCOS

Glede na pojavljanje PCOS v družinah imajo genetski dejavniki verjetno pomembno vlogo v patogenezi tega sindroma. Kompleksnost klinične slike PCOS podpira predpostavko o oligogenskem genetskem modelu (10).

Pod genetskimi dejavniki tveganja razumemo t. i. tvegane genetske polimorfizme, ki preko uravnavanja transkripcijske aktivnosti ciljnih genov, udeleženi v patogenetskih poteh pri PCOS, vplivajo na nivo izražanja teh genov. Doslej so že za številne genetske polimorfizme dokazali njihovo pomembno vlogo v patogenezi mnogih genetsko pogojenih boleznih pri človeku, s klasičnim primerom bolezni trinukleotidnih zaporedij. Tvegani genetski polimorfizmi so različnih tipov, najpogosteje polimorfizmi različnega števila tandemskih ponovitev (mikrosatelitski in minisatelitski polimorfizmi), v nekaterih primerih tudi polimorfizmi posameznih nukleotidov (11).

Na osnovi rezultatov analiz genske povezanosti so bili predlagani ter nato z asociacijskimi študijami ("primer-kontrola") in testi vezavnega neravnovesja v družinah analizirani že številni kandidatni geni in genetski polimorfizmi za PCOS (1, 12, 13). Najobetavnejši kandidatni geni za PCOS so navedeni v *preglednici 1*.

Kljub intenzivnim raziskavam genetskega ozadja PCOS in nekaterim obetajočim rezultatom ostaja z genetskega stališča velik delež kompleksnega spektra patofizioloških sprememb pri PCOS še nepojasnen. Doslej še za nobenega od predlaganih genetskih dejavnikov niso uspeli nedvoumno dokazati njegove vloge v nastanku PCOS. Prihodnost odkrivanja genetskih vzrokov PCOS je: (i) v študijah na čim večjem številu preiskovank (velike multicentrične študije) z natančno opredeljenimi kriteriji za vključitev v raziskavo, (ii) v uporabi statističnih metod, razvitih posebej za statistično obravnavo kompleksnih bolezni, kot je PCOS (14), (iii) v vrednotenju hkratnega vpliva več različnih kandidatnih genov na razvoj in posamezne fenotipske značilnosti PCOS ter (iv) v uporabi novih molekularno

genetskih pristopov, med katerimi trenutno največ obeta tehnologija mikromrež (15-19).

1.5 Mikrosatelitski polimorfizem (TAAA)n v promotorju gena SHBG

Gen *SHBG* (kromosomska lokacija 17p13-p12) nosi zapis za SHBG, specifičen plazemski prenašalni glikoprotein za spolne hormone. Serumske koncentracije SHBG vplivajo na biološko razpoložljivost in posledično na biološke učinke androgenov: pri nižji koncentraciji SHBG v serumu je delež prostih androgenov večji in biološki učinki androgenov močnejši. Na značilno raznolikost serumskih koncentracij SHBG med posamezniki vplivajo spol, starost, prehrabni, hormonski, metabolni dejavniki, v največji meri pa verjetno genetski dejavniki (20). Zvišane serumske koncentracije androgenov in inzulina znižujejo serumske koncentracije SHBG. Glede na rezultate dosedanjih študij so serumske koncentracije SHBG znižane (in s tem dostop prostih androgenov do tarčnih tkiv večji) pri bolnicah s hiperandrogenizmom, pri bolnicah s PCOS ter pri posameznikih, ki imajo večje tveganje za razvoj sladkorne bolezni tipa 2 in za razvoj srčno-žilnih obolenj (21).

V neposredni bližini 5'- konca promotorja gena *SHBG*, znotraj zaporedja *Alu*, so nedavno odkrili mikrosatelitski polimorfizem

Preglednica 1 : Kandidatni geni za PCOS

Table 1: PCOS candidate genes

1) Geni, udeleženi v biosintezi, metabolizmu oz. delovanju androgenov
• geni za steroidogene encime (npr. geni <i>CYP11A</i> , <i>CYP17</i> , <i>CYP19</i> , <i>CYP21</i>)
• gen za androgeni receptor (gen <i>AR</i>)
• gen za vezavni globulin za spolne hormone (gen <i>SHBG</i>)
2) Geni, udeleženi v izločanju oz. delovanju inzulina
• gen za inzulin (gen <i>INS</i>)
• gen za inzulinski receptor (gen <i>INSR</i>)
• geni za substrate na inzulinskem receptorju (gena <i>IRS-1</i> , <i>IRS-2</i>)
• gen za kalpain 10 (gen <i>CAPN10</i>)
• gen za inzulinu podoben rastni dejavnik 2 (gen <i>IGF2</i>)
3) Geni, udeleženi v sproščanju, uravnavanju oz. delovanju gonadotropinov
• gen za luteinizirajoči hormon (gen <i>LH</i>)
• gen za receptor za LH
• gen za folistatin
4) Geni, vključeni v presnovne procese v maščobnem tkivu
• gen za leptin
• gen za receptor za leptin
• gen <i>PPARγ</i> (angl. <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ</i>)
• gen za adiponektin
• gen za inhibitor plazminogenskega aktivatorja 1 (gen <i>PAI-1</i>)
5) Drugi geni
• gen za receptor za dejavnik tumorske nekroze (gen <i>TNFR</i>)
• gen za paraoksonazo (gen <i>PON1</i>)
• geni za različne interlevkine

(TAAAA)_n, ki naj bi v povezavi z nekaterimi drugimi bližnjimi genetskimi označevalci uravnaval izražanje gena *SHBG in vitro* (22) in posledično vplival tudi na serumske koncentracije SHBG. Doslej so opisali šest alelnih različic (TAAAA)_n SHBG, in sicer alelne različice s 6, 7, 8, 9, 10 in 11 ponovitvami TAAAA (23, 24).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali mikrosatelitski polimorfizem (TAAAA)_n v promotorju gena *SHBG* vpliva na serumske koncentracije SHBG ter na razvoj PCOS v slovenski populaciji preiskovank. S tem smo želeli razširiti dosedanje znanje o genetskem ozadju hiperandrogenizma pri PCOS in dodati nov prispevek k razumevanju mehanizmov nastanka te bolezni.

2 Materiali in metode

2.1 Preiskovanke

V študijsko skupino smo vključili 118 bolnic s potrjeno diagnozo PCOS (2). Vse bolnice so imele motnje menstruacijskega ciklusa (oligomenoreja ali amenoreja), PCO na ultrazvoku (3), razmerje serumskih koncentracij LH/FSH > 2 in vse so bile biokemično in/ali klinično hiperandrogene. Klinično smo hiperandrogenizem opredelili s prisotnostjo hirzutizma (indeks po Ferriman-Gallwey \geq 8) in/ali aknavosti, biokemijsko pa z zvišanimi serumskimi koncentracijami celokupnega testosterona (Tsk), dehidroepiandrosteron sulfata in/ali androstendiona. Pri bolnicah, ki so imele serumske koncentracije Tsk višje od 4,8 nmol/L, so bili s predhodno klinično obravnavo izključeni drugi možni vzroki hiperandrogenizma (3).

Kontrolno skupino je sestavljalo 108 zdravih prostovoljk z izključeno diagnozo PCOS. V polovici primerov so bile ženske v kontrolni skupini zdrave nosečnice, ki so spontano zanosile (dokazana plodnost), v drugi polovici primerov pa ženske, sicer vključene v postopek oploditve z biomedicinsko pomočjo, vendar izključno zaradi mehanskega vzroka neplodnosti ali zaradi neplodnosti moškega partnerja. Nobena od preiskovank v kontrolni skupini v preteklosti ni imela endokrinih in avtoimunskih bolezni ter operacij v medeničnem predelu.

Vse preiskovanke so bile mlade ženske (starost primerljiva med obema skupinama), kavkazijske rase in med seboj niso bile v sorodu. Obravnavane so bile v sklopu redne ambulantne dejavnosti, z rutinskimi postopki na Ginekološki kliniki v Ljubljani, v letih 2002-2005. V raziskavi so sodelovale prostovoljno, na podlagi pisne privolitve, po predhodni seznanitvi z namenom odvzema krvi za genetsko analizo in s potekom dela naše raziskave.

Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 97/05/01).

2.2 Materiali in metode

Biokemijske analize

V serumskih vzorcih, odvzetih v zgodnji folikularni fazi menstruacijskega ciklusa oz. naključno pri bolnicah z amenorejo, smo določali koncentracije SHBG in Tsk (opravljeno na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani). Za merjenje koncentracij SHBG smo uporabili kemoluminiscenčno imunometrično reakcijo (SHBG-Immulate; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles,

ZDA), za Tsk pa radioimunski test s tržno dostopnim kompletom TESTO-CTK (DiaSorin, Saluggia, Italija). Koeficienti variacije znotraj posamezne serije ter med različnimi serijami so bili za oba analita v območju med 3 % in 11 %.

Za vse preiskovanke smo izračunali indeks telesne mase (ITM) po splošni formuli: $ITM = \text{telesna masa [kg]} / (\text{telesna višina})^2 [m^2]$.

Molekularno genetske metode

Preiskovankam smo odvzeli po 5 ml periferne krvi v sterilne epruvete z 1/10 antikoagulantna EDTA. Genomsko DNA smo pri vseh preiskovankah izolirali iz levkocitov polne periferne krvi s pomočjo tržno dostopnega kompleta *FlexiGene DNA kit 250* (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija), v skladu z navodili proizvajalca. Reakcijska raztopina za reakcijo PCR je v končnem volumnu 15 μ L vsebovala naslednje komponente v navedenih končnih koncentracijah oz. količinah: 90 °C ng genomske DNA, 0,2 μ M vsakega od začetnih oligonukleotidov (5'-GAA CTC GAG AGG CAG AGG CAG CAG TGA-3' in 5'-AGA AAT CAC CCA CTC CCT GA-3'), 0,2 mM vsakega od dNTP-jev, 1-kratni pufer za PCR (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, ZDA), 1,5 mM MgCl₂ ter 1 enoto encima polimeraze DNA *AmpliTaq Gold™* (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, ZDA). Reakcijski pogoji so bili sledeči: začetni 10-minutni denaturaciji pri 95 °C je sledilo 30 ciklov s 45 sekund trajajočo denaturacijo pri 94 °C, 45-sekundnim prileganjem začetnih oligonukleotidov pri 63 °C in podaljševanjem verige DNA 1 minuto pri 72 °C; zaključno podaljševanje na novo sintetizirane verige DNA pa je potekalo 7 minut pri 72 °C.

Različno dolge produkte reakcije PCR smo ločevali z elektroforezo na tržno dostopnih gelih *Spreadex™ EL400 Mini* v elektroforeznem aparatu *SEA 2000* (Elchrom Scientific, Cham, Švica), v skladu z navodili proizvajalca (pri 55 °C, 141 minut). Fragmente DNA smo obarvali z barvilom *Syber Gold* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) in rezultate preverili pod ultravijolično svetlobo. Na število ponovitev osnovnega motiva smo sklepali iz dolžin pomnoženih fragmentov DNA, izmerjenih glede na označevalec velikosti M3 (Elchrom Scientific, Cham, Švica) ter glede na notranji standard. Slednjega smo predhodno pripravili z neposrednim sekveniranjem šestih različno dolgih produktov reakcije PCR, dolžine 133 bp, 138 bp, 143 bp, 148 bp, 153 bp in 158 bp, kar ustreza številu ponovitev TAAAA 6-11 (opravljeno v Laboratoriju za molekularno genetiko na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani).

Statistična analiza

Test χ^2 smo uporabili za statistično vrednotenje razlik v frekvencah alelov in genotipov med študijsko in kontrolno skupino preiskovank ter v primeru ugotavljanja Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Za primerjavo povprečnih vrednosti ITM, serumskih koncentracij Tsk in SHBG med dvema različnima skupinama preiskovank smo uporabili Studentov t-test, za primerjavo povprečnih vrednosti serumskih koncentracij SHBG med tremi različnimi skupinami preiskovank pa test analize variance (ANOVA). Nelinearne povezave med posameznimi parametri smo opredelili s Spearmanovimi koeficienti korelacije, linearne povezave pa s Pearsonovimi koeficienti korelacije. Za napovedovanje serumskih koncentracij SHBG smo uporabili ustrezen linearni regresijski model, za napovedovanje statusa PCOS

(prisotnost/odsotnost PCOS) pa ustrezno logistično regresijsko analizo.

Vse statistične analize smo opravili z računalniškim programom za statistično analizo *SPSS for Windows*, verzija 12.0 (SPSS Inc., Illinois, ZDA). Merilo za statistično značilno različenost je bila vrednost $p < 0,05$.

3 Rezultati in razprava

3.1 Biokemijski in klinični profil preiskovank

Bolnice s PCOS so imele v primerjavi s preiskovankami v kontrolni skupini značilno nižje serumske koncentracije SHBG ($p < 0,001$). Značilno nižane serumske koncentracije SHBG pri ženskah s PCOS navajajo tudi v predhodnih študijah (23, 24). Nadalje so imele naše bolnice značilno višji ITM ($p < 0,001$) in značilne višje serumske koncentracije Tsk ($p < 0,001$), kar je potrditev značilnih lastnosti klinične slike PCOS. Rezultati so prikazani v preglednici 2.

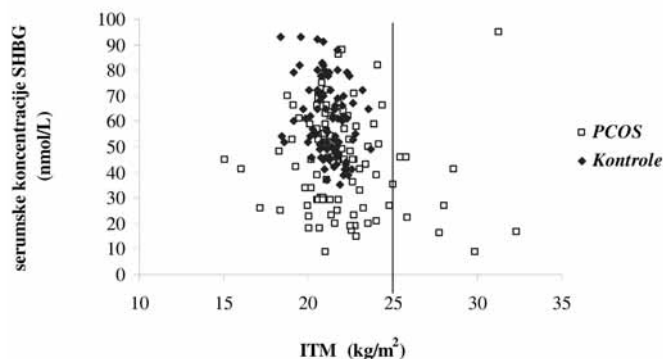
Vse ženske v kontrolni skupini so bile vitke ($18 \text{ kg/m}^2 \leq \text{ITM} \leq 25 \text{ kg/m}^2$), medtem ko je 13,6 % bolnic imelo telesno težo prekomerno ($\text{ITM} > 25 \text{ kg/m}^2$), preostale bolnice pa so bile vitke. Glede na predhodna klinična opažanja debelost pri bolnicah s PCOS značilno poslabša klinično sliko (1), kar smo s preverjanjem povezanosti ITM-ja s serumskimi koncentracijami Tsk in SHBG poskušali delno opredeliti tudi za naše preiskovanke. V skupini bolnic sta bila parametra ITM in serumske koncentracije Tsk značilno pozitivno korelirana ($R = 0,276$; $p = 0,002$), medtem ko serumske koncentracije SHBG v splošnem niso bile značilno povezane z ITM niti v študijski niti v kontrolni skupini. Iz slike 2 je razvidno, da se pri ITM v normalnem območju serumske koncentracije SHBG v obeh skupinah gibljejo v relativno širokem razponu, medtem ko smo pri bolnicah s prekomerno telesno težo opazili težnjo k nižjim serumskim koncentracijam SHBG. Slednje opažanje, katerega zaradi premajhnega števila bolnic s prekomerno telesno težo sicer nismo mogli ustrezno statistično ovrednotiti, nasprotuje izsledkom predhodne študije na francoski populaciji bolnic s PCOS (s hirutizmom) (24), v kateri sicer ugotavljajo značilno negativno korelacijo med serumskimi koncentracijami SHBG in ITM, vendar je le-ta omejena na vitke bolnice (z $\text{ITM} < 25 \text{ kg/m}^2$).

Na osnovi zgornjih rezultatov ocenjujemo, da bi debelost pri naših bolnicah lahko bila pomemben dejavnik za poslabšanje tako

Preglednica 2: Povprečne vrednosti (\pm SD) nekaterih parametrov v skupini bolnic s PCOS ter v kontrolni skupini preiskovank

Table 2: Mean values (\pm SD) of some parameters in PCOS and control patients

	Bolnice	Kontrole	p
SHBG (nmol/L)	44,4 \pm 19,1	61,0 \pm 14,7	< 0,001
Tsk (nmol/L)	3,0 \pm 1,3	1,2 \pm 0,4	< 0,001
ITM (kg/m^2)	22,3 \pm 3,1	21,2 \pm 1,1	0,001



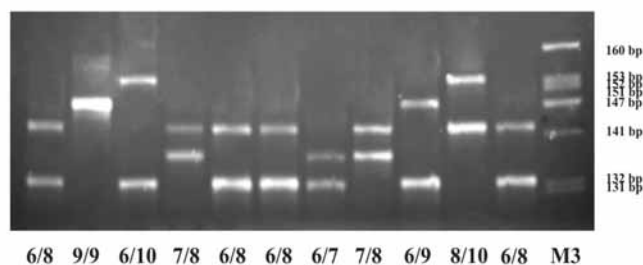
Slika 2: Odvisnost serumskih koncentracij SHBG od ITM

Figure 2: Serum SHBG levels in relation to BMI

biokemičnega kot tudi kliničnega hiperandrogenizma, vendar bi bilo za dokončne zaključke v raziskavo potrebno vključiti mnogo večje število preiskovank.

3.2 Molekularno genetska analiza polimorfizma (TAAAA)_n v genu SHBG

Pri naših preiskovankah smo ugotovili prisotnost alelov SHBG s 6, 7, 8, 9, 10 in 11 ponovitvami TAAAA ter 18 različnih (od 21 možnih) genotipov (TAAAA)_n SHBG (preglednica 3). Genotipske frekvence v obeh skupinah preiskovank so bile v Hardy-Weinbergovem ravnovesju. Primer rezultata molekularno genetske analize polimorfizma (TAAAA)_n v genu SHBG je prikazan na sliki 3.



Slika 3: Primer identifikacije genotipov (TAAAA)_n SHBG: Slikano pod ultravijolično svetlobo (254 nm) po elektroforezni ločitvi produktov PCR na gelih Spreadex™ EL400 Mini in barvanju z barvilom Syber Gold (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); genotipi SHBG so označeni kot število ponovitev TAAAA na obeh alelih SHBG; M3-označevalec velikosti (Elchrom Scientific, Cham, Švica).

Figure 3: An example of the (TAAAA)_n SHBG genotype identification: The picture was taken under the ultraviolet light (254 nm) after the electrophoresis of PCR products on Spreadex™ EL400 Mini gels and after the staining with Syber Gold dye (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); the genotypes are designated as the number of TAAAA repeats on both of the two SHBG alleles. M3-marker (Elchrom Scientific, Cham, Switzerland).

Preglednica 3: Frekvence alelov in genotipov (TAAAA)_n SHBG v skupini bolnic s PCOS ter v kontrolni skupini preiskovank: Aleli so označeni s 6-11, kar ustreza številu ponovitev TAAAA.

Table 3: The (TAAAA)_n SHBG allele and genotype frequencies in PCOS and control group of patients: The alleles are designated as 6-11, indicating the number of TAAAA repeats.

Frekvence alelov (TAAA) _n SHBG (%)						
	6	7	8	9	10	11
PCOS	27,1	4,9	31,1	27,1	9,8	0
Kontrole	31,4	6,4	30,9	20,4	9,1	1,8

Frekvence genotipov (TAAA) _n SHBG (%)																		
	6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	7/8	7/9	7/10	7/11	8/8	8/9	8/10	8/11	9/9	9/10	9/11	10/10
PCOS	7,3	5,7	18,7	10,6	6,5	0	3,3	2,4	0,8	0	10,6	13	5,7	0	11,4	4,9	0	0,8
Kontrole	10,9	4,5	18,2	12,7	4,5	0,9	3,6	0,9	2,7	0,9	10	14,5	4,5	0,9	3,6	4,5	0,9	0,9

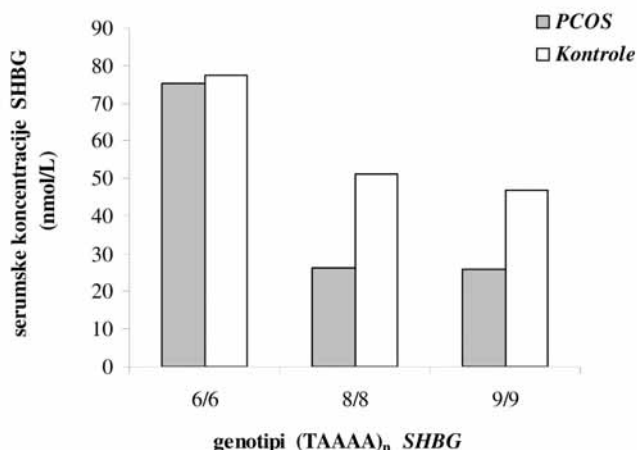
Medtem ko je v skupini zdravih preiskovank prisotnih več krajših alelov SHBG (alelov s 6 in 7 ponovitvami TAAAA), je v skupini bolnic prisotnih več daljših alelov SHBG (alelov z 8, 9 in 10 ponovitvami TAAAA), vendar pa med obema skupinama preiskovank razlika v porazdelitvi posameznih alelov ni dosegla statistične značilnosti ($p = 0,169$). Glede na pomanjkanje informacij v zvezi s tem, kateri od obeh alelov SHBG v paru se prednostno izraža (25-27), smo naredili logistično regresijo z napovednima parametroma SHBGk (število ponovitev TAAAA na krajšem od obeh alelov SHBG v paru) in SHBGd (število ponovitev TAAAA na daljšem od obeh alelov SHBG v paru) ter statusom PCOS (prisotnost oz. odsotnost PCOS) kot izidom. Pokazalo se je, da parametra SHBGk in SHBGd nista značilna za PCOS ($p = 0,225$ za SHBGk in $p = 0,860$ za SHBGd). Ob primerjavi porazdelitev povprečnih vrednosti števila ponovitev za vsak posamezen genotip (par alelov) (SHBGp) med študijsko in kontrolno skupino preiskovank prav tako nismo ugotovili statistično pomembnih razlik ($p = 0,628$). Sklepamo, da navedeni polimorfizem ni ključen dejavnik tveganja za sam razvoj PCOS oz. je njegov vpliv prešibek, da bi ga lahko zaznali pri naši velikosti vzorca preiskovank. Za razliko od naših rezultatov pa navajajo značilno večjo frekvenco alelov oz. genotipov SHBG z več kot 8 ponovitvami TAAAA za 185 Grkinj s PCOS (23).

3.3 Vpliv polimorfizma (TAAAA)_n v genu SHBG na serumske koncentracije SHBG

Tako v študijski kot tudi v kontrolni skupini preiskovank je bila korelacija med serumskimi koncentracijami SHBG in genetskim parametrom SHBGp statistično značilno negativna ($p < 0,001$ za obe skupini preiskovank). Linearna regresija s serumskimi koncentracijami SHBG kot odvisno spremenljivko, genetskim parametrom SHBGp kot napovednim parametrom in ITM kot možnim motečim dejavnikom je pokazala, da tako pri bolnicah s PCOS kot tudi v kontrolni skupini preiskovank analizirani genetski parameter z visoko značilnostjo napoveduje serumske koncentracije SHBG ($p < 0,001$ v obeh skupinah); natančneje, genotipi SHBG z večjim številom ponovitev TAAAA na obeh alelih značilno napovedujejo nižje serumske koncentracije SHBG. Z uporabljenim regresijskim modelom smo uspeli pojasniti kar 55,3 % (prilagojena vrednost R^2) raznolikosti v serumskih koncentracijah SHBG v skupini bolnic ter 33,1 % v kontrolni

skupini. Rezultate o značilnem negativno koreliranem odnosu med polimorfizmom (TAAAA)_n SHBG in serumskimi koncentracijami SHBG pri bolnicah s PCOS navajajo tudi v študiji, v katero so bile vključene 303 Francozinje s hirutizmom, med katerimi je bilo 154 bolnic s PCOS (24), ter za 185 Grkinj s PCOS (23). Zanimivo je, da so rezultati naše študije in doslej objavljenih študij *in vivo* v nasprotju z rezultati študije *in vitro* na človeških hepatoblastomskih celicah HepG2; v slednji so namreč ugotovili, da imajo konstrukti SHBG s 6 ponovitvami značilno manjšo transkripcijsko aktivnost kot konstrukti s 7-10 ponovitvami TAAAA (22).

V nadaljevanju smo zaradi pomanjkljivih podatkov glede prednostnega izražanja alelov (TAAAA)_n SHBG (26-28) ter zaradi relativno nizkih frekvenc pojavljanja nekaterih genotipov obravnavali le homozigotne genotipe z relativno visoko pojavnostjo: tj. genotipe 6/6, 8/8 in 9/9. Frekvenca genotipa 6/6 je bila v skupini bolnic s PCOS



Slika 4: Serumske koncentracije SHBG v odvisnosti od homozigotnega genotipa (TAAAA)_n SHBG: Genotipi so zapisani kot število ponovitev TAAAA na obeh alelih SHBG.

Figure 4: Serum SHBG levels in relation to the (TAAAA)_n SHBG homozygous genotypes: The genotypes are designated as the number of TAAAA repeats on both of the two SHBG alleles.

opazno nižja, frekvenca genotipa 8/8 primerljiva in frekvenca genotipa 9/9 opazno višja v primerjavi z ustreznimi frekvencami v kontrolni skupini (preglednica 3). Za obe skupini preiskovank je odvisnost serumskih koncentracij SHBG od homozigotnega genotipa (TAAAA)_n SHBG prikazana na sliki 4. V primeru genotipa 6/6 v serumskih koncentracijah SHBG ni bilo značilnih razlik med bolnicami s PCOS in ženskami iz kontrolne skupine ($p = 0,756$), medtem ko je bila razlika značilna v primeru genotipov 8/8 ($p < 0,001$) in 9/9 ($p < 0,001$). Sklepamo lahko, da na serumske koncentracije SHBG pri PCOS v primeru genotipov z daljšimi aleli poleg genotipa v znatni meri vplivajo še drugi patogenetski dejavniki. Nadalje smo opazili, da so bile znotraj obeh skupin preiskovank razlike v serumskih koncentracijah SHBG med genotipi 6/6, 8/8 in 9/9 visoko značilne ($p < 0,001$ za obe skupini), in sicer v primeru genotipa 6/6 značilno višje glede na genotipa 8/8 in 9/9, med genotipoma 8/8 in 9/9 pa primerljive. Dejanski vpliv alelov SHBG z 8 ponovitvami TAAAA na serumske koncentracije SHBG bi lahko prikrila različica D327N v eksonu 8 gena SHBG, ki je v močnem vezavnem neravnovesju z alelom (TAAAA)₈ in za katero so ugotovili, da značilno podaljša biološko razpolovno dobo SHBG v serumu (24).

4 Sklep

V raziskavi na specifičnem vzorcu slovenskih bolnic s PCOS ugotovljamo, da je mikrosatelitski polimorfizem (TAAAA)_n v promotorju gena SHBG pomemben napovedni dejavnik serumskih koncentracij SHBG; daljši aleli so povezani z nižjimi serumskimi koncentracijami SHBG in s tem z večjim tveganjem za razvoj hiperandrogenizma pri PCOS. Čeprav je vpliv obravnavanega polimorfizma na serumske koncentracije SHBG značilno močnejši pri bolnicah, je izražen tudi pri zdravih ženskah v kontrolni skupini. Sklepamo, da polimorfizem (TAAAA)_n SHBG ni edini genetski dejavnik tveganja za razvoj klinične slike PCOS, temveč da gre najverjetneje za vpliv specifične kombinacije več različnih genetskih polimorfizmov v povezavi z nekaterimi dejavniki iz okolja.

Uspešno odkritje genetskih vzrokov PCOS obeta v prihodnosti vpeljavo novih diagnostičnih in terapevtskih pristopov, možnost genetskega svetovanja in s tem izboljšanje celostne obravnave bolnic s PCOS, še zlasti možnost določanja individualnega profila genetskih dejavnikov tveganja in s tem prilagoditev klinične obravnave za vsako bolnico posebej (28). Za vse ženske v tej skupini je značilen urejen menstruacijski cikel s hkratno odstotnostjo kliničnih in biokemijskih znakov hiperandrogenizma ter z odstotnostjo PCO.

5 Seznam okrajšav

PCOS	sindrom policističnih jajčnikov (<i>angl. Polycystic Ovary Syndrome</i>)
PCO	policistični jajčniki (le morfološko) (<i>angl. Polycystic Ovaries</i>)
SHBG	vezavni globulin za spolne hormone (<i>angl. Sex Hormone – Binding Globulin</i>)
LH	luteinizirajoči hormon
FSH	folikle stimulirajoči hormon
Tsk	celokupni testosteron
ITM	indeks telesne mase

DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>angl. DeoxyriboNucleic Acid</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. Polymerase Chain Reaction</i>)
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat (<i>angl. DeoxyriboNucleotide TriPhosphate</i>)
A, C, T, G	adenin, citozin, timin, gvanin
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (<i>angl. EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>)
M	molarna koncentracija
SHBG	oznaka za gen, ki nosi zapis za vezavni globulin za spolne hormone
SHBGk	število ponovitev TAAAA na krajšem od obeh alelov SHBG v paru
SHBGd	število ponovitev TAAAA na daljšem od obeh alelov SHBG v paru
SHBGp	povprečno število ponovitev za posamezen genotip (par alelov) SHBG

6 Literatura

- 1) Fratantonio E, Vicari E, Pafumi C, Calogero AE. Genetics of polycystic ovarian syndrome. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 713-720.
- 2) The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81: 19–25.
- 3) Balen A, Conway GS, Homburg R, Legro RS. Polycystic ovary syndrome: a guide to clinical management; Defining the polycystic ovary syndrome. Taylor & Francis group, 2005: 7-22.
- 4) Conway GS, Honour JW, Jacobs HS. Heterogeneity of the polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine and ultrasound features in 556 patients. *Clin Endocrinol* 1989; 30: 459–470.
- 5) Legro RS, Kunselman A, Dodson WC, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 165-169.
- 6) Orio F Jr, Palomba S, Spinelli L et al. The cardiovascular risk of young women with polycystic ovary syndrome: an observational, analytical, prospective case-control study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3696-3701. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5621.
- 7) Strauss JF 3rd. Some new thoughts on the pathophysiology and genetics of polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 997: 42-48.
- 8) Gharani N, Waterworth DM, Batty S et al. Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 397-402.
- 9) Developmental origin of polycystic ovary syndrome- a hypothesis. *J Endocrinol* 2002; 174: 1-5.
- 10) Genetics of ovarian disorders: polycystic ovary syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 2004; 5: 69-76.
- 11) Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics; Instability of the human genome: mutation and DNA repair. Garland Science (Taylor & Francis Group), 2003: 316-349.
- 12) Amato P, Simpson JL. The genetics of polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18: 707-718.

- 13) Urbaneck M, Legro RS, Driscoll DA et al. Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 8573-8578.
- 14) Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 983-989.
- 15) Wood JR, Nelson VL, Ho C et al. The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis. *J Biol Chem* 2003; 278: 26380-26390.
- 16) Diao FY, Xu M, Hu Y et al. The molecular characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS) ovary defined by human ovary cDNA microarray. *J Mol Endocrinol* 2004; 33: 59-72.
- 17) Jansen E, Laven JS, Dommerholt HB et al. Abnormal gene expression profiles in human ovaries from polycystic ovary syndrome patients. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 3050-3063.
- 18) Wood JR, Ho CK, Nelson-Degrave VL et al. The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. *J Reprod Immunol* 2004; 63: 51-60.
- 19) Oksjoki S, Soderstrom M, Inki P et al. Molecular profiling of polycystic ovaries for markers of cell invasion and matrix turnover. *Fertil Steril* 2005; 83: 937-944.
- 20) Ukkola O, Rankinen T, Gagnon J et al. A genome-wide linkage scan for steroids and SHBG levels in black and white families: the HERITAGE Family Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3708-3720.
- 21) [OMIM*182205](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM). On Line Mendelian Inheritance in Man (OMIM); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
- 22) Hogeveen KN, Talikka M, Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin promoter activity is influenced by a (TAAAA)_n repeat element within an Alu sequence. *J Biol Chem* 2001; 276: 36383-36390.
- 23) Xita N, Tsatsoulis A, Chatzikyriakidou A, Georgiou I. Association of the (TAAAA)_n repeat polymorphism in the sex hormone-binding globulin (SHBG) gene with polycystic ovary syndrome and relation to SHBG serum levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5976-5980.
- 24) Cousin P, Calemard-Michel L, Lejeune H et al. Influence of SHBG gene pentanucleotide TAAAA repeat and D327N polymorphism on serum sex hormone-binding globulin concentration in hirsute women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 917-924.
- 25) Hogeveen KN, Cousin P, Pugeat M et al. Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction. *J Clin Invest* 2002; 109: 973-981.
- 26) Hilpert J, Vorum H, Burmeister R et al. Efficient eukaryotic expression system for authentic human sex hormone-binding globulin. *Biochem J* 2001; 360: 609-615.
- 27) Jänne M, Deol HK, Power SGA et al. Human sex hormone-binding globulin gene expression in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 123-136.
- 28) Franks S. Genetic and environmental origins of obesity relevant to reproduction. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 526-531.