

Matjaž Merc², Luka Notar³, Andrej Janež⁴

Insulinska rezistenca pri bolnicah s sindromom policističnih ovarijev¹

Insulin Resistance in Patients with Polycystic Ovary Syndrome

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: policistični jajčnik sindromi, inzulinska rezistenca

Sindrom policističnih ovarijev (SPO) je najpogostejša endokrina bolezen žensk v rodni dobi. Tesno je povezan z inzulinsko rezistenco (IR). V raziskavi smo hoteli ovrednotiti pomen nekaterih kliničnih in laboratorijskih označevalcev za določanje IR pri ženskah s SPO. Namen je bil potrditi klinično najuporabnejši kazalec IR med HOMA_{IR}, intaktnim proinsulinom (IP), kazalcem Sib in kazalcem IRIS II. Izbrali smo 50 žensk s SPO in 20 primerljivih zdravih žensk za kontrolno skupino. Vrednosti HOMA_{IR}, ki kažejo IR (>2), so bile dokazane pri 26 preiskovankah s SPO (52 %). Pri bolnicah z IR (po HOMA_{IR}) je bila ugotovljena statistično značilna razlika v ITM ($p < 0,001$), glukozi na tešče ($4,7 \pm 0,6$ in $4,2 \pm 0,3$ mmol/l, $p = 0,001$), insulinu ($16,8 \pm 6,2$ in $7,1 \pm 2,1$ μ U/ml, $p < 0,001$), IP ($3,2 \pm 2,0$ in $1,8 \pm 1,0$ pmol/l, $p = 0,004$), trigliceridih ($1,16 \pm 0,77$ in $0,80 \pm 0,35$ mmol/l, $p = 0,04$), kazalcu Sib ($6,65 \pm 2,61$ in $22,07 \pm 11,36$, $p < 0,001$) in kazalcu IRIS II (24 ± 19 in 11 ± 11 , $p = 0,008$) v primerjavi z IS-preiskovankami s SPO. Primerjava med kontrolno skupino, IS- in IR-preiskovankami s SPO je pokazala statistično značilno razliko v ITM ($p < 0,001$), trigliceridih ($p = 0,048$), HDL ($p < 0,001$), glukozi na tešče ($p = 0,004$), insulinu ($p < 0,001$), IP ($p = 0,001$), HOMA_{IR} ($p < 0,001$), kazalcu IRIS II ($p = 0,003$) in kazalcu Sib ($p < 0,001$). Rezultati so pokazali, da preiskovanke s SPO niso dosegle dovolj velike IR, ki bi povzročila prekomerno izločanje IP namesto insulina. Med opazovanimi označevalci in kazalci smo dokazali, da sta HOMA_{IR} in Sib najzanesljivejša kazalca za določanje in spremljanje IR pri SPO. Kazalec IRIS II je bil manj občutljiv od ostalih kazalcev, prav tako ni pri njem nobena od preiskovank dosegla predpisane meje za IR, ki je določena pri bolnikih s SB2.

ABSTRACT

KEY WORDS: polycystic ovary syndrome, insuline resistance

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disease in fertile women. It is also closely associated with insulin resistance (IR). The purpose of this trial was to investigate the value of clinical and laboratory IR markers routinely used in type 2 diabetes patients (DM2) for the diagnosis of IR in PCOS patients. The goal was to identify the most suitable marker for this condition out of the entire tested panel, which was comprised of HOMA_{IR},

¹ Raziskovalno delo je bilo nagrajeno s fakultetno Prešernovo nagrado za leto 2007.

² Matjaž Merc, dr. med., Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana.

³ Luka Notar, dr. med., Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana.

⁴ Doc. dr. Andrej Janež, dr. med., Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana.

intact proinsulin (IP), Sib index and IRIS II score. A total of 50 women with PCOS were recruited, along with 20 comparable, healthy women for the control group. $HOMA_{IR}$ values indicating IR (>2) were seen in 26 patients (52%). Patients with IR (based on $HOMA_{IR}$) had significantly higher values for BMI ($p < 0.001$), fasting glucose (4.7 ± 0.6 vs. 4.2 ± 0.3 mmol/l, $p = 0.001$), insulin (16.8 ± 6.2 vs. 7.1 ± 2.1 μ U/ml, $p < 0.001$), IP (3.2 ± 2.0 vs. 1.8 ± 1.0 pmol/l, $p = 0.004$), triglycerides (1.16 ± 0.77 vs. 0.80 ± 0.35 mmol/l, $p = 0.04$), Sib index (6.65 ± 2.61 vs. 22.07 ± 11.36 , $p < 0.001$) and IRIS II score (24 ± 19 vs. 11 ± 11 , $p = 0.008$). A comparison between the control group and PCOS patients with IR and IS showed significant differences in BMI ($p < 0.001$), triglycerides ($p = 0.048$), HDL ($p < 0.001$), fasting glucose ($p = 0.004$), insulin ($p < 0.001$), IP ($p = 0.001$), $HOMA_{IR}$ ($p < 0.001$), IRIS II score ($p = 0.003$) and Sib index ($p < 0.001$). The results of this study indicate that our patients with PCOS did not reach a level of IR that would result in higher IP secretion instead of insulin secretion. Out of the entire tested panel, $HOMA_{IR}$ score and Sib appeared to be the most suitable markers to assess IR in our patient population. IRIS II score was less sensitive than $HOMA_{IR}$ or Sib. None of the patients reached the required IRIS II threshold in DM2 for IR either. Therefore, $HOMA_{IR}$ and Sib may be suitable indexes for the diagnosis and therapeutic monitoring of IR in this specific patient population.

UVOD

Sindrom policističnih ovarijev (SPO) je najpogostejša endokrina bolezen žensk v rodni dobi. Njeno prevalenco v tej populaciji ocenjujejo na 5–10%. Predstavlja tudi najpogostejši vzrok neplodnosti pri ženskah z motnjami menstrualnega ciklusa (1, 2). Sindrom opredeljujejo androgenizacija, motnje menstrualnega ciklusa, ultrazvočni znaki policističnih ovarijev in metabolne motnje (3). Dolgo časa je veljalo, da je debelost edini znak metabolnih motenj (4). Zadnja dognanja pa kažejo, da je bistvena insulinska rezistenca (IR), ki ima tudi osrednjo patogenetsko vlogo (5–9). IR in posledična hiperinsulinemija lahko motita ovulacijo in povzročata androgenizacijo (10).

Kriteriji sindroma policističnih ovarijev

Pri postavitvi diagnoze se upoštevajo rotterdamški kriteriji iz leta 2003 (3). SPO je, po izključitvi drugih endokrinih motenj (hiperprolaktinemija, prezgodnja menopavza, Cushingov sindrom, virilizirajoči tumorji, pozno nastala kongenitalna adrenalna hiperplazija), definiran z upoštevanjem dveh od treh kriterijev (3):

- oligo- ali anovulacija (oligomenoreja, primarna ali sekundarna amenoreja, redkeje polimenoreja, metroragija, odsotnost napestosti dojk med menstruacijo),

- klinični (hirsutizem in/ali androgenetična alopecija in/ali aknavost) in/ali biokemični znaki hiperandrogenizma (zvišana serumska koncentracija vsaj enega od androgenih hormonov: testosteron, androstendion, dihidroepiandrostendion – DHEAS),
- UZ-slika policističnih ovarijev (povečana prostornina jajčnikov, povečana in hiperehogena stroma in najmanj 8 cist premera 2–8 mm, razporejenih okrog hiperehogene strome).

Insulinska rezistenca

Insulinska rezistenca (IR) je po definiciji stanje, kjer je insulin normalne strukture in biološke aktivnosti, nima pa želenih bioloških učinkov (11, 12). IR pomeni predvsem motnjo v prenosu glukoze v tarčna tkiva insulinskega delovanja. Pri osebah z IR se ob stimulaciji z insulinom na površini celic izrazi manjše število prenašalcev GLUT 4 kot pri osebah, ki nimajo IR (13). Domneva se, da gre za okvaro v začetnem delu poti od insulinskega receptorja do glukoznih prenašalcev. Na celični ravni naj bi šlo za motnjo fosforilacije insulinskega receptorja, kar vodi v manjšo fosforilacijo substratov insulinskega receptorja (14). Na IR se telo odzove z hiperinsulinemijo, kar posledično privede do »pešanja« celic beta Langerhansovih otočkov trebušne slinavke. To sprva lahko povzroči moteno toleranco za glu-

kozy in kasneje vodi v nastanek sladkorne bolezni tipa II (SB2) (15, 16).

Metode za določanje IR

IR lahko določamo z različnimi metodami. Zlati standard predstavlja klasični evglike-mični hiperinsulimični clamp, ki pa je zahteven in nepraktičen za velike epidemiološke študije oz. vsakdanjo klinično rabo (17). IR lahko izračunamo tudi s pomočjo matematičnega modela *homeostasis model assessment* ($HOMA_{IR}$). $HOMA_{IR}$ je računalniški model, s katerim na osnovi koncentracije glukoze in insulina ovrednotimo IR. Rezultati modela $HOMA_{IR}$ za oceno IR so bili primerjani z neodvisnimi rezultati hiperglikemičnega clampa in intravenskega glukoznega tolerančnega testa. V obeh primerih je stopnja korelacije visoka (18).

Epidemiološke študije kažejo, da se indeks $HOMA_{IR}$ pri sladkornih bolnikih in bolnicah s SPO dobro ujema z metodo clampa (17). Za bolnice, katerih vrednosti indeksa $HOMA_{IR}$ presežejo 75 percentilo oziroma imajo vrednost nad 2, sklepamo, da imajo IR (19).

IR lahko določamo tudi s pomočjo indeksa Sib. Ta v izračunu upošteva serumski insulin in glukozo, ki jo določimo na tešče, ter težo bolnika. Mejna vrednost, ki kaže na IR, je $\leq 11,5$ (20).

Metoda ocene IRIS II je model za izračun IR, ki ga izračunamo s pomočjo vrednosti indeksa telesne mase (ITM), glukoze na tešče, trigliceridov in HDL-holesterola na tešče ter ob upoštevanju morebitne hipertenzije (krvni tlak $\geq 140/90$ mmHg) (21).

Vpliv IR na kriterije SPO

IR ima osrednjo vlogo pri razvoju SPO. Prek različnih mehanizmov vpliva na androgenizacijo in motnje ovulacije.

Najpomembnejši so štirje mehanizmi androgenizacije (22–25):

- neposredno delovanje insulina na ovarij, ki spodbudi intraovarijsko sintezo androgenov,
- motenje izločanja gonadotropinov,
- zaviranje tvorbe vezalne beljakovine za spolne hormone (SHBG),
- pospeševanje ACTH-stimulirane sekrecije androgenov iz nadledvične žleze.

Receptorji za insulin se nahajajo tudi na hipofizi.

S spodbujanjem hipofize se izloči več luteinizirajočega hormona (LH), ki vpliva na ovarijski encimski sistem P450c17. To vodi v povečano izločanje androgenov (25). Prav tako obstajajo na ovariju lastni receptorji za insulin, ki se razlikujejo od tistih, ki so odgovorni za glukozni transport v tkiva. Gre za receptorje IGF1 in/ali hibridne receptorje IGF1 – insulinski receptorji. Prenos informacije poteka po drugih celičnih poteh, zato ne pride do odpornosti na insulin (26). Insulin spodbuja nastajanje novih receptorjev za LH, s čimer potencira delovanje LH, ki se sprošča iz hipofize. Poleg tega insulin povečuje občutljivost receptorjev za ACTH, s čimer se tvori več androgenov (27). Z inhibicijo tvorbe vezalne beljakovine za spolne hormone povzroča, da je na razpolago več androgenov (28).

Označevalci insulinske rezistence v visceralnem maščevju

Pri bolnicah s SPO je pogosta debelost centralnega tipa, ki se pojavlja v 35–50 % (29). Visceralno maščevje je odporno na antilipolitični učinek insulina, zato se kljub povišanim vrednostim insulina v krvi sproščajo proste maščobne kisline (PMK) (30–32). Te so osnova za razvoj IR. V jetrih in mišičnem tkivu povzročijo odpornost na insulin ter pospešujejo glukoneogenezo v jetrih. Znano je tudi, da je visceralno maščevje metabolno aktivno. Izloča različne adipocitokine, ki se vpletajo v nastanek IR in so predmet številnih raziskav. To so predvsem tumor nekrotični faktor alfa, interleukin 6, adiponektin, leptin, resistin, visfatin, retinol binding protein 4 in drugi (33). Najpogosteje proučevani označevalec IR pri bolnicah s SPO je adiponektin. Adiponektin je pomemben adipocitokin, ki se izloča v maščobnem in vezivnem tkivu. Kaže protivnetne in antiaterogene učinke. Na različne načine izboljša insulinsko občutljivost. V jetrih poveča oksidacijo prostih maščobnih kislin, zmanjša sintezo lipidov, zmanjša privzem prostih maščobnih kislin in zmanjša glukoneogenezo. Znano je, da adiponektin zmanjša plazemske proste maščobne kisline in glukozo (33–35). Študije so pokazale, da so tudi pri

bolnicah s SPO nižje plazemske vrednosti adiponektina povezane z visokim ITM in IR (36).

Intaktni proinsulin kot označevalec insulinske rezistence

V zadnjem letu se veliko raziskuje vloga intaktnega proinsulina (IP) v mehanizmu nastanka IR. Vloga IP pri različnih bolezenskih stanjih, ki tudi povzročajo IR, do sedaj še ni bila proučevana. IP se je izkazal kot visoko specifični označevalec IR pri bolnikih s SB2 (37). Znano je, da povečane zahteve po insulinu zaradi IR privedejo do točke (praga), ko je presežena kapaciteta encima karboksipeptidaza H betacelic trebušne slinavke in poleg zelenega insulina se začne kopičiti IP. IP ni ena sama, stabilna oblika, ampak ima tudi različne razpadne produkte. Tako je proinsulin des31,32 običajen produkt betacelic v poznih stadijih SB2 in udeležen v razvoju makrovaskularne bolezni, medtem ko proinsulin des64,65 običajno ni prisoten v cirkulaciji.

NAMEN IN HIPOTEZE

V raziskavi smo želeli natančneje oceniti pomen določanja intaktnega proinsulina kot možnega napovednega dejavnika IR pri ženskah s SPO ter ovrednotiti vlogo že obstoječih metod določanja IR.

Pri tem smo želeli ugotoviti:

- ali se insulinsko rezistentne preiskovanke s SPO razlikujejo v koncentraciji serumskih vrednostih intaktnega proinsulina od preiskovank s SPO, ki niso insulinsko rezistentne;
- ali se insulinsko rezistentne preiskovanke s SPO razlikujejo v indeksih insulinske rezistence (IRIS II, Sib) od preiskovank s SPO, ki niso insulinsko rezistentne;
- ali se insulinsko rezistentne in nerezistentne preiskovanske s SPO ter kontrolna skupina primerljivih preiskovank brez SPO razlikujejo v vrednostih intaktnega proinsulina in v indeksih insulinske rezistence (IRIS II, Sib);
- ali obstaja povezava med stopnjo insulinske rezistence, določene z modelom (HOMA_{IR}, Sib, IRIS II), in koncentracijo intaktnega proinsulina.

METODE

Preiskovanke

V raziskavo smo vključili 50 žensk s SPO in 20 primerljivih zdravih žensk za kontrolno skupino. Bolnice s SPO smo glede vrednosti indeksa HOMA_{IR} razdelili na insulinsko rezistentne (n = 26) in nerezistentne oz. insulinsko senzitivne (IS, n = 24). Iz študije so bile izločene ženske s SPO, ki imajo sladkorno bolezen tip 1 ali tip 2, in ženske, ki so v 60-ih dneh pred študijo prejemale zdravila, ki vplivajo na reproduktivno ali metabolno funkcijo.

Vse osebe, ki so bile vključene v študijo, so pred pričetkom raziskave podale pisno izjavo o sodelovanju v študiji. Izjava je bila skladna s Helsinško-tokijsko deklaracijo, potrjena pri nacionalnem etičnem komiteju in v skladu s klasifikacijo *National Institute of Child and Human Development criteria* (NICHD).

Anamneza in klinični pregled

Pri vseh preiskovankah smo opravili anamnezo in klinični pregled. Krvni tlak je bil pri vseh določen kot povprečje treh meritev z živosrebrnim sfigmoidnim manometrom po Riva-Roccijevi metodi. Stopnjo prehranjenosti smo merili z ITM (izračunan kot razmerje med telesno težo in kvadratom višine).

Odvzem krvi, oralni glukozni tolerančni test in laboratorijske preiskave

Odvzem krvi in oralni glukozni tolerančni test (OGTT) sta pri vseh preiskovankah potekala v enakih pogojih (zjutraj med 7. in 8. uro, na tešče). Iz komolčne vene smo odvzeli 12 ml krvi v vakuumске epruvete za biokemične preiskave.

Pri OGTT smo preiskovankam dali v obliki tekočine oralno 75 g glukoze, ki so jo morale zaužiti v 5 minutah. Ob zaužitju in po dveh urah smo odvzeli vzorec krvi za določitev glukoze v krvi. Za diagnozo sladkorne bolezni mora biti ta koncentracija višja od 11 mmol/l. Istočasno je bil na tešče tudi odvzem krvi za določitev insulina, IP in lipidov. Dobljene vzorce krvi smo centrifugirali, dobljen serum pa zamrznili na -40 °C do pričetka analize.

Določitev koncentracije glukoze v serumu

Določanje vrednosti glukoze je bilo opravljeno z metodo PAP (metoda glukoze oksidaze; Roche Hitachi 917 in Olympus, Hamburg). Glukoza se pod vplivom encima glukoza oksidaza in kisika iz zraka oksidira. Pri tem nastaja tudi vodikov peroksid, ki z encimom peroksidazo povzroči kondenzacijo fenola s 4-aminoantipirinom. Pri tem nastaja kinonim, ki ga merimo spektrofotometrično.

Določitev koncentracije celokupnega holesterola, LDL-holesterola, HDL-holesterola in trigliceridov v serumu

Koncentracije lipidov so bile določene s standardnimi metodami (Olympus Corp. Analyser, New Hyde Park, NY). Pri določanju celokupnega holesterola smo uporabili metodo CHOD-PAP. V prvi stopnji se iz lipoproteinov z encimoma holesterolna oksidaza tvori holesterol in vodikov peroksid; v drugi stopnji pa vodikov peroksid z encimom peroksidazo povzroči kondenzacijo fenola s 4-aminofenazolom. Pri tem nastaja obarvan kinonim, katerega količino določamo spektrofotometrično. Za določanje koncentracije HDL-holesterola je postopek enak, le da predhodno lipoproteine VLDL, IDL in LDL oborimo. Trigliceride določamo kolorimetrično, s postopkom GPO-PAP. Gre za štiristopenjsko reakcijo z encimi lipaza, glicerolna kinaza, glicerolfosfatna oksidaza in peroksidaza, pri čemer nastaja obarvan kinonim, katerega količino določamo spektrofotometrično.

Vzorke za določanje glukoze in lipidov smo analizirali v laboratoriju Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Določitev insulina v serumu

Insulin smo določali z imunoradiometričnim testom (Biosource Europe S. A., Nivelles, Belgija). Princip metode temelji na reverzibilni nekovalentni vezavi med zaznamovanim radioaktivnim antigenom (^{125}J) in insulinom. Pri tem nastaja obarvan kompleks, katerega količino merimo spektrofotometrično. Vzorke smo analizirali v laboratoriju Klinike za nuklearno medicino Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Določitev intaktnega proinsulina v serumu

Intaktni proinsulin smo dobili s specifično ELISA-metodo (Zentech, Liege, Belgija). Pri tej metodi prekrijemo mikrotiter proinsulina s specifičnimi protitelesi, uperjenimi proti proinsulinski molekuli. Po inkubaciji v drugem delu pripravimo encimski konjugat, ki je monoklonsko protitelo s hrenovo peroksidazo proti proinsulinu. Po ponovni inkubaciji speremo nevezan konjugat z vzorca. Na koncu dodamo substratno raztopino in glede na spremembo barvne intenzitete določimo koncentracijo proinsulina (39). Vzorci so bili analizirani v Nemčiji na IKFE *Institute for Clinical Research and Development*, Mainz.

Kazalci za določanje IR in IS

HOMA_{IR}

Glavni kriterij, po katerem smo razdelili bolnice s SPO v dve skupini glede na IR, je bil vrednost kazalca HOMA_{IR} (enačba 1) (18). Vrednost kazalca HOMA_{IR} $\geq 2,0$ je določena za mejno vrednost za insulinsko rezistenco (19).

Enačba 1. *Kazalec HOMA_{IR}*

$$\text{HOMA}_{\text{IR}} = I(\mu\text{U/ml}) \times G(\text{mmol/l}) / 22,5$$

I – serumski insulin na tešče, *G* – plazemska glukoza na tešče.

IRIS II

Ocena IRIS II je model, po katerem na podlagi vrednosti ITM, glukoze, trigliceridov in HDL-holesterola ter ob upoštevanju morebitne hipertenzije bolnika (trenutni krvni tlak $\geq 140/90$ mmHg) ugotavljamo IR (tabela 1). Če je seštevek točk, ki jih odčitamo iz tabele, skupaj ≥ 70 , gre za insulinsko rezistenco (21).

Sib-kazalec

Sib-kazalec je podoben kazalcu HOMA_{IR}, le da pri izračunu upoštevamo še telesno težo bolnika (enačba 2). Mejna vrednost Sib, ki kaže na IR, znaša $\leq 11,5$. Pričakovana senzitivnost kazalca znaša 73 %, specifičnost pa 79 % (21).

Enačba 2. *Kazalec Sib*.

$$\text{Sib} = 100.000.000 / (I[\mu\text{U/ml}] \times G[\text{mg/dl}] \times 150 [\text{ml}] \times \text{TT}[\text{kg}])$$

I – insulin, *G* – glukoza, *TT* – telesna teža, faktor konverzije za glukozo iz mmol/l v mg/dl znaša 18,0147.

Tabela 1. Tabela za izračun kazalca IRIS II.

	Normotenzivni (točke)	Hipertenzivni (točke)
ITM (kg/m ²)		
< 26,4	0	0
26,4 ≤ 29,4	6	7
29,4 ≤ 33,1	12	14
> 33,1	18	21
Glukoza na tešče (mmol/l)		
< 5,49	0	0
5,49 ≤ 6,11	22	22
6,11 ≤ 7,05	34	34
> 7,05	48	48
Trigliceridi na tešče (mmol/l)		
< 1,30	0	0
1,30 ≤ 1,81	3	1
1,81 ≤ 2,59	6	2
> 2,59	9	3
HDL-holesterol na tešče (mmol/l)		
< 1,01	27	30
1,01 ≤ 1,19	18	20
1,19 ≤ 1,40	9	10
> 1,40	0	0

žensk s SPO analizirani z neodvisnim dvo-smernim Studentovim t-testom, s katerim smo statistično primerjali obe skupini po povprečnih vrednostih preiskovanih parametrov. Vrednosti $p < 0,05$ so bile ovrednotene kot statistično značilne. Z metodo Pearsonove korelacije smo ugotavljali linearne povezave med posameznimi spremenljivkami. Kontrolno skupino in obe skupini preiskovank s SPO smo primerjali z enosmernim testom analize variance, ki je parametrični test. Tudi pri tem testu smo statistično primerjali povprečne vrednosti, tokrat vseh treh skupin, vrednosti, nižje od $p < 0,05$, pa so bile ovrednotene kot statistično značilne.

Analiza podatkov je bila izvedena s programom za izračun statističnih vrednosti: SPSS for Windows (Version 14.0, SPSS inc., Chicago, IL, ZDA) in programom Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft corp., ZDA).

REZULTATI

Klinične značilnosti preiskovank

Klinične značilnosti preiskovank s SPO in kontrolne skupine so prikazane v tabeli 2. Vse tri skupine preiskovank so bile po kliničnih značilnostih zelo podobne, saj so se razlikovale le po teži oz. ITM.

Primerjava med IR- in IS-preiskovankami s SPO brezčasne primerjave kontrolne skupine je pokazala, da se obe skupini prav tako med seboj razlikujeta le po teži in ITM. Pri obeh vrednostih je bila raven tveganja (p) $< 0,001$.

Statistična analiza podatkov

V statistični analizi smo glede na indeks $HOMA_{IR}$ primerjali razlike med IR- in IS-preiskovankami s SPO. Osnovne vrednosti smo prikazali s srednjo vrednostjo in standardno deviacijo za povezane spremenljivke in z odstotki za kategorične podatke. Različni bioznačevalci in kazalci so bili pri obeh skupinah

Tabela 2. Klinične značilnosti preiskovank s SPO in kontrolne skupine. Prva skupina je insulinsko rezistentna ($HOMA_{IR} > 2$), druga je senzitivna ($HOMA_{IR} < 2$), tretja pa predstavlja kontrolno skupino. V tabeli so prikazane srednje vrednosti, standardni odkloni, vzročna porazdelitev razmerja varianc (F) in raven tveganja (p). ANOVA – analiza variance, ITM – indeks telesne mase, NS – ni pomembne razlike.

	IR _{HOMA} > 2	IS _{HOMA} < 2	Kontrolna skupina	ANOVA	
				F	p
Št. preiskovank	26	24	20		
Starost (leta)	25 ± 6	24 ± 3	24 ± 5	0,192	NS
Teža (kg)	85 ± 18	67 ± 11	63 ± 10	16,153	< 0,001
Višina (cm)	167 ± 5	167 ± 7	164 ± 7	2,232	NS
ITM (kg/m ²)	30,29 ± 5,95	24,11 ± 3,87	23,78 ± 4,56	13,524	< 0,001
Sistolični krv. tlak (mmHg)	121 ± 15	117 ± 15	114 ± 12	1,106	NS
Diastolični krv. tlak (mmHg)	73 ± 18	74 ± 9	74 ± 9	0,051	NS

Rezultati primerjave med IR- in IS-preiskovankami s SPO

Biokemične preiskave

V laboratorijski analizi odvzete krvi smo med skupinama preiskovank ugotovili pomembne razlike v serumskih koncentracijah insulina in glukoze, vrednosti trigliceridov pa so bile mejne s tveganjem 4%. Prav tako smo ugotovili občutne statistične razlike koncentracij IP, kljub temu da so bile vrednosti pri vseh preiskovankah pod spodnjo referenčno mejo ($p < 11,5 \text{ pmol/l}$), ki kaže pri bolnicah s SB2 brez SPO na IR. Analiza HDL-holesterola ni pokazala zadostne razlike med obema skupinama (slika 1).

Vrednosti kazalcev

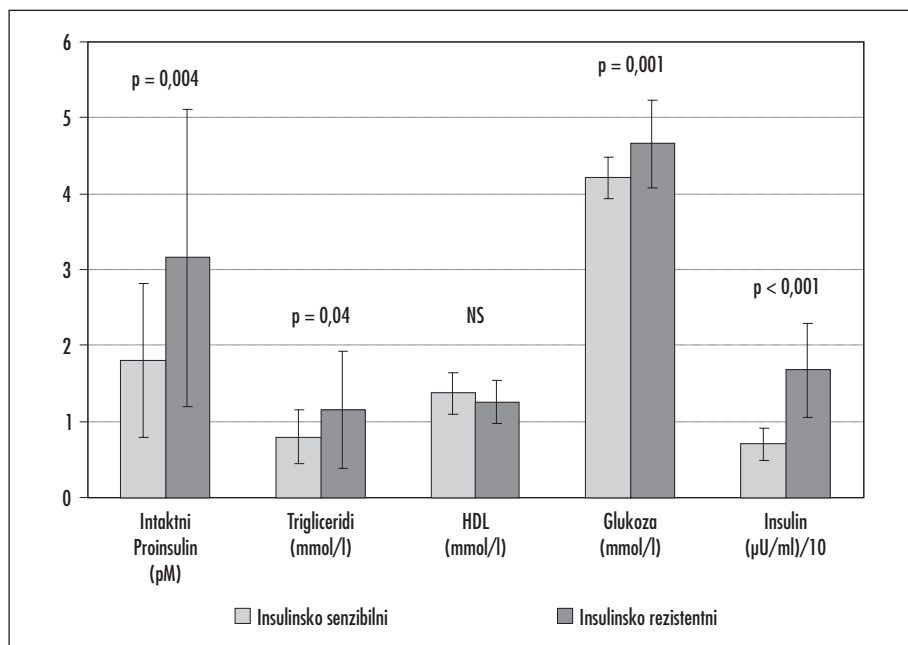
Vrednosti HOMA_{IR} kažejo na IR ($\text{HOMA}_{\text{IR}} > 2$) pri 52% bolnic. Statistične razlike kažeta tako IRIS II kot indeks Sib, čeprav je bil pri vseh bolnicah indeks IRIS II pod spodnjo referenčno vrednostjo (< 70) (slika 2).

Analiza povezanosti med IP, kazalcem IRIS II in Sib z vrednostjo HOMA_{IR} pri preiskovankah s SPO

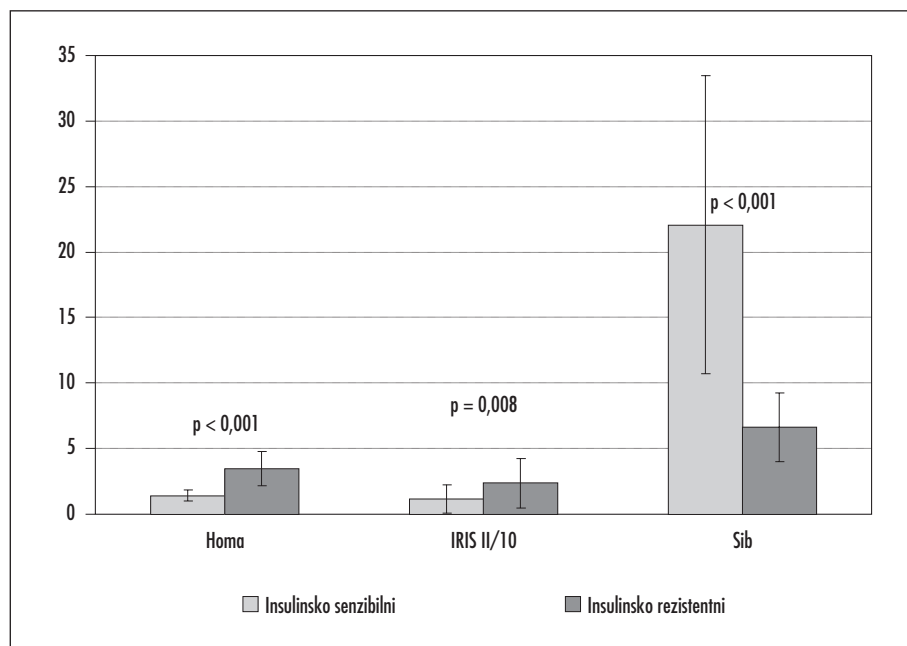
S statistično metodo Pearsonove korelacije smo ugotovili značilno povezavo med IP, IRIS II in indeksom Sib z vrednostjo HOMA_{IR} . Pri Sib je bilo ugotovljeno linearno zniževanje, v drugih dveh primerih pa zviševanje (slike 3, 4, 5).

Analiza variance opazovanih kazalcev in označevalcev pri IS- in IR-preiskovankah s SPO ter kontrolno skupino

Analiza variance je pokazala pomembno razliko med IS- in IR-preiskovankami ter kontrolno skupino pri vseh preiskovanih indeksnih vrednostih in tudi pri IP. Prav tako so bile ugotovljene razlike v biokemičnih vrednostih trigliceridov, HDL-holesterola, insulina in glukoze (tabela 3).

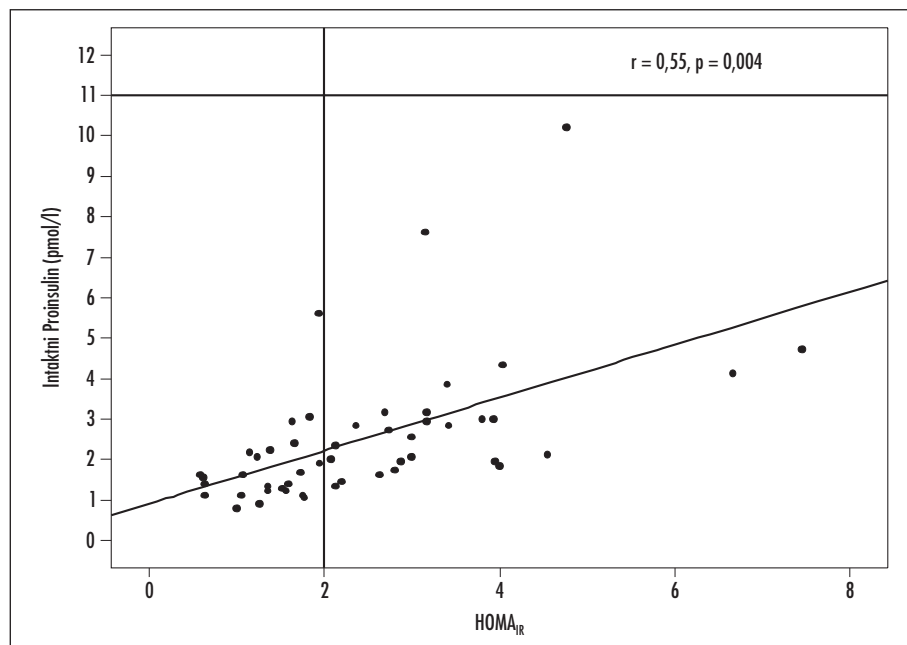


Slika 1. Primerjava analiziranih označevalcev pri obeh skupinah bolnic s SPO. Prva skupina je insulinsko rezistentna ($\text{HOMA}_{\text{IR}} > 2$), druga pa senzitivna ($\text{HOMA}_{\text{IR}} < 2$). V grafikonu so prikazane srednje vrednosti, standardni odkloni in raven tveganja (p).

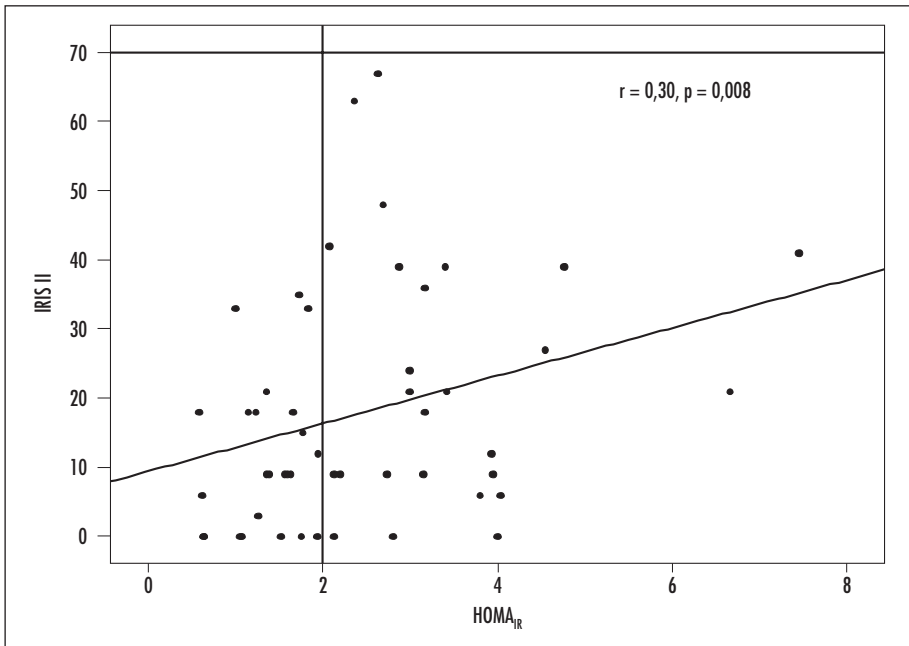


Slika 2. Primerjava indeksnih vrednosti pri bolnicah s SPO. Prva skupina je insulinsko rezistentna ($HOMA_{IR} > 2$), druga pa senziitivna ($HOMA_{IR} < 2$). S stolpci so prikazane srednje vrednosti, na njih so visani standardni odkloni in raven tveganja (p).

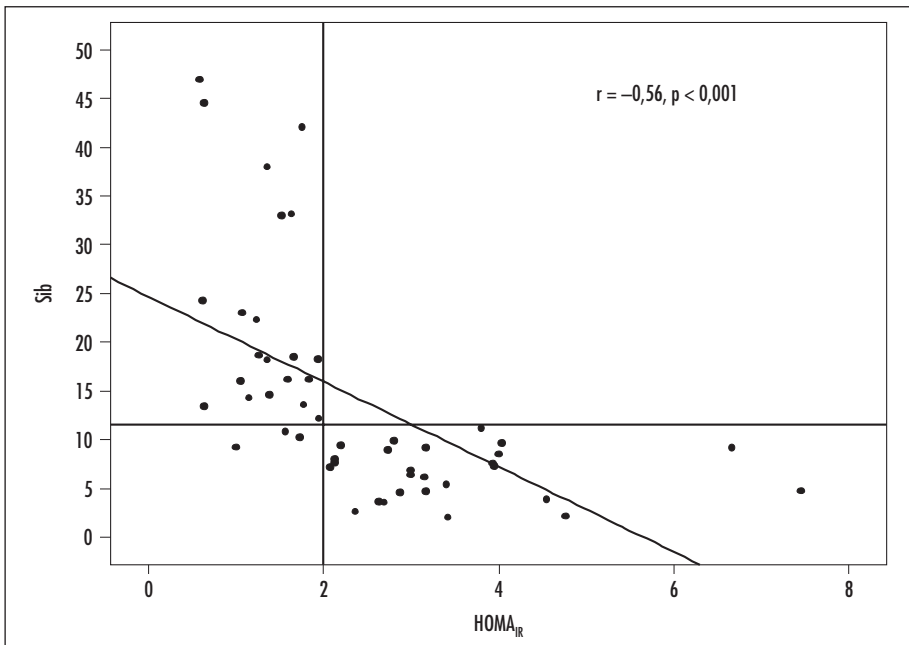
212



Slika 3. Povezanost $HOMA_{IR}$ z intaktim proinsulinom pri vseh preiskovankah s SPO. V grafikonu sta prikazana koeficient korelacije (r) in raven tveganja (p).



Slika 4. Povezanost $HOMA_{IR}$ s kazalcem IRIS II pri vseh preiskovankah s SPO. V grafikonu sta prikazana koeficient korelacije (r) in raven tveganja (p).



Slika 5. Povezanost med $HOMA_{IR}$ in kazalcem Sib pri vseh preiskovankah s SPO. V grafikonu sta prikazana koeficient korelacije (r) in raven tveganja (p).

Tabela 3. Analiza variance med insulinso rezistentnimi in senzitivnimi ženskami s SPO ter kontrolno skupino. V tabeli so prikazane srednje vrednosti in standardni odkloni za insulinso rezistentne in insulinso senzitivne ženske s SPO ter kontrolno skupino in vzročna porazdelitev razmerja varianc (F) in raven tveganja (p). ANOVA – analiza variance, ITM – indeks telesne mase, NS – ni pomembne razlike.

	IR _{HOMA} > 2	IS _{HOMA} < 2	Kontrolna skupina	ANOVA	
				F	p
Trigliceridi (mmol/l)	1,16 ± 0,77	0,80 ± 0,35	0,89 ± 0,24	3,186	0,048
HDL (mmol/l)	1,25 ± 0,29	1,37 ± 0,29	0,83 ± 0,37	18,45	<0,001
Glukoza (mmol/l)	4,70 ± 0,60	4,21 ± 0,28	4,40 ± 0,42	6,12	0,004
Insulin (μU/ml)	16,8 ± 6,21	7,07 ± 2,14	6,02 ± 2,52	47,491	<0,001
Intaktni proinsulin (pM)	3,15 ± 1,95	1,80 ± 1,01	1,91 ± 0,73	7,248	0,001
HOMA _{IR}	3,45 ± 1,3	1,33 ± 0,43	1,17 ± 0,45	52,828	<0,001
IRIS II	32 ± 19	11 ± 11	26 ± 12	6,346	0,003
Sib	6,65 ± 2,61	22,07 ± 11,36	25,66 ± 9,49	33,781	<0,001

RAZPRAVLJANJE

Namen naše raziskave je bil ovrednotiti vlogo IP kot možnega označevalca IR pri populaciji žensk s SPO in ga primerjati z različnimi, že uveljavljenimi metodami določanja IR: HOMA_{IR}, IRIS II in Sib. Rezultate obeh skupin žensk s SPO smo primerjali s kontrolno skupino primerljivih zdravih žensk.

Pri populaciji žensk s SPO smo ugotovili linearno povezano spreminjanje vrednosti vseh treh indeksov z višanjem IR. Ugotovili smo, da so vrednosti IP pri IR-populaciji višje od tistih pri IS ter prav tako med sabo povezane. Pri preučevanju drugih laboratorijskih kazalcev smo v populacijah ugotovili pomembne razlike v koncentraciji glukoze, insulina in trigliceridov, medtem ko v koncentraciji HDL-holesterola ni bilo pomembnih razlik. Pri ugotavljanju kliničnih značilnosti smo ugotovili razlike v teži in ITM.

Uporabljene metode

Na začetku smo imeli zgolj populacijo žensk s SPO. Skupino je bilo treba razdeliti na IR in IS. Kot glavni indeks za določanje IR in IS smo uporabili indeks HOMA_{IR}, nato pa naredili še primerjavo z IP, IRIS II in Sib.

Za referenčno ločevanje med IR in IS smo izbrali indeks HOMA_{IR}, saj je to splošno sprejeta metoda za določevanje IR v epidemioloških študijah. Izračun je enostaven, metoda pa dobro korelira s standardno metodo evglike-mičnega hiperinsulemičnega clampa (37).

IR, določena z metodo HOMA_{IR}

Že v uvodu je omenjeno, da je IR stanje, kjer je insulin normalne strukture in biološke aktivnosti, nima pa želenih bioloških učinkov. Analiza podatkov z metodo HOMA_{IR} je pokazala, da je imelo IR 26 od 52 preiskovank, kar je 52%. IR je pomembna, saj je osnova za razvoj SPO. Kljub temu smo predvidevali, da bi moral biti ta odstotek višji.

IR, določena z metodo IRIS II

Po podatkih iz literature je meja za IR pri bolnikih s SB2 vrednost indeksa IRIS II več kot 70, česar ni imela nobena od naših preiskovank. Vendar je pomembnejši rezultat Studentovega t-testa, ki je pokazal statistično razliko med obema skupinama. Z metodo IRIS II bi najverjetneje lahko ločevali IR- od IS-žensk s SPO, vendar metoda ni dovolj zanesljiva, saj nismo dosegli želenega rezultata pri točkovnem vrednotenju. V prihodnosti bi morali določiti referenčno vrednost za IRIS II pri ženskah s SPO, ki je očitno nižja od vrednosti pri bolnikih s SB2.

IR, določena s Sib

Sib-indeks se izračuna na podoben način kot HOMA_{IR}, vendar upošteva še telesno maso, kar da rezultatu še dodatno težo. Vrednost t-testa je zato pričakovano pokazala izredno signifikanco, s tem pa pomembno razliko med obema populacijama. Tudi Sib bi se lahko

uporabljal kot metoda za določevanje IR pri ženskah s SPO. Metoda je še boljša od $HOMA_{IR}$, saj upošteva tudi telesno težo, po drugi strani pa je s tem pot do končnega rezultata še bolj kompleksna.

Določevanje IP

IP je perspektiven označevalec, ki doslej še ni bil uporabljen za določanje IR pri ženskah s SPO. Pomemben je v kasnejših stopnjah razvoja hiperinsulinemije, ko je presežena kapaciteta encima, ki cepi IP v insulin (37). Do sedaj imamo edino znane podatke o njegovi vlogi kot označevalcu pri bolnikih s SB2. Pri analizi podatkov dveh skupin bolnic s SPO, ki smo ju ločili s $HOMA_{IR}$ na IR in IS, smo na podlagi t-testa ugotovili statistično pomembne razlike med skupinama. Kljub pomembni razliki pa nobena od bolnic ni preseгла referenčne vrednosti 11,5 pmol, ki je doslej opisana v literaturi kot mejna za določanje IR (19). Vendar je treba opozoriti, da je ta vrednost (11,5 pmol) nastavljena za bolnice s SB2, ne pa za bolnice s SPO. Zato bi morali v prihodnosti narediti kakšno večjo študijo, ki bi definirala novo mejno vrednost za populacijo s SPO.

Določevanje ostalih laboratorijskih kazalcev

Ob IP smo določevali tudi vrednosti serumske glukoze, insulina in trigliceridov ter HDL-holesterola. Pri IR-preiskovankah s SPO smo v primerjavi z IS kot tudi v primerjavi s kontrolno skupino ugotavljali povišane vrednosti glukoze in insulina, kar je v skladu s pričakovanji, saj je IR stanje, ko ni pravilnega privzema glukoze v tkiva, posledica pa hiperinsulinemija (15). Pričakovane so bile tudi povišane vrednosti trigliceridov v krvi, saj je ena od značilnosti SPO debelost in s tem povezana povečana aktivnost adipoznega tkiva, s povečanim sproščanjem PMK, ki predstavljajo substrat za tvorbo trigliceridov in VLDL-delcev v jetrih (31).

Določevanje kliničnih značilnosti

Opazovali smo različne klinične značilnosti, ki bi lahko ločevale populacijo preiskovank. Že v uvodu smo omenili, da je ena od kliničnih značilnosti debelost, saj se veliko označeval-

cev tvori v adipoznem tkivu, ki je metabolno aktivno in izloča adipocitokine. Pri analizi smo ugotovili, da ni pomembnih razlik v starosti, višini, sistoličnem in diastoličnem krvnem tlaku. Prisotne pa so razlike pri teži in ITM. Predvsem povišana telesna teža je povsem v skladu s pričakovanji, obenem pa seveda premalo, da bi zgolj na podlagi telesne teže sklepali o prisotnosti SPO.

Povezava med IR, IP in IRIS II ter $HOMA_{IR}$ in Sib

Povezava med IP in $HOMA_{IR}$

Vrednosti $HOMA_{IR}$ so sorazmerne povišanim koncentracijam insulina v krvi. Ob višji IR bo večja stopnja hiperinsulinemije in večje vrednosti indeksa $HOMA_{IR}$. Sočasno bo ob večji IR prišlo do čedalje večjega popuščanja celic beta, kar bo privedlo do višjih koncentracij IP (37). Pričakovali bi linearno povezanost, kar smo z vrednostjo Pearsonove korelacije tudi dokazali ($r = 0,55$).

Povezava med IRIS II in $HOMA_{IR}$

Za vrednosti $HOMA_{IR}$ pričakujemo, da bodo naraščale, saj se z večjo IR povečuje hiperinsulinemija. Indeks $HOMA_{IR}$ je odvisen od koncentracije glukoze in insulina v serumu. Vrednosti IRIS II so odvisne od večjega števila dejavnikov: vrednosti ITM, glukoze, trigliceridov, HDL-holesterola in upoštevanja morebitnega bolnikovega povečanega krvnega tlaka. Pričakovali bi naraščajoče vrednosti glukoze, večjo IR ob večjem ITM, višje vrednosti trigliceridov zaradi ITM in nižje vrednosti HDL-holesterola. Pri opazovanju kliničnih značilnosti smo ugotovili, da se vrednosti trigliceridov niso povečale, zato lahko vpliv trigliceridov in ITM zanemarimo. Povezava zato ne more biti povsem linearna, obstaja pa neka pozitivna povezava, kar imamo na grafu Pearsonove korelacije tudi prikazano ($r = 30$).

Povezava med Sib in $HOMA_{IR}$

Indeksa Sib in $HOMA_{IR}$ upoštevata vrednosti serumskega insulina in glukoze, Sib pa upošteva še telesno težo. Razlika je, da so pri $HOMA_{IR}$ vrednosti glukoze in insulina v števcu, kar vodi v naraščajoč rezultat pri večanju

IR. Pri Sib pa je ravno obratno, kar pomeni, da vrednosti padajo. Pričakovali smo negativno linearno povezavo, kar smo s Pearsonovo korelacijo tudi dokazali ($r = -0,56$).

Preiskovanke s SPO in kontrolna skupina

Primerjava obeh skupin žensk s SPO s kontrolno skupino zdravih žensk primerljive starosti je pokazala, da pričakovano obstajajo pomembne biokemične razlike med klinično podobnimi ženskami, ki so se med seboj razlikovale le v teži. Analiza ostalih opazovanih vrednosti pa je pokazala, da pri vseh biokemičnih označevalcih in kazalcih obstajajo pomembne razlike.

To si lahko razlagamo s poznavanjem narave boleznih SPO, ki je endokrina bolezen in ki vpliva na metabolne procese v telesu, kar pogosto vodi v IR. To se posledično kaže s spremembo vseh omenjenih vrednosti pri bolnicah s SPO, ki so sicer pri kontrolni skupini v mejah normale. S tem smo dokazali pravilno odločitev pri izbiri opazovanih označevalcev in kazalcev v naši raziskavi.

Ugotovitve

Najpomembnejša ugotovitev naše raziskave je, da IP ni dober označevalec za določanje IR pri preiskovankah s SPO. Pri IR-preiskovankah s SPO je sicer prišlo do dviga IP, vendar ne do zadostne koncentracije, da bi prišel

nad referenčno mejo. IP zato ni dober označevalec za IR v naši populaciji.

HOMA_{IR} je splošno sprejeta metoda za določevanje IR pri bolnicah SB2. Tudi pri naši populaciji žensk s SPO je bila primerna za določevanje IR. Z metodo IRIS II smo dobili razlike med IR in IS, vendar nobena od žensk ni dosegla referenčne meje, ki sicer velja za populacijo s SB2. Z metodo Sib smo lahko ločili IR-ženske od IS-žensk s SPO. Za vse metode se je izkazalo, da so v pravilnem medsebojnem odnosu.

Ženske s SPO in IR se ločijo po kliničnih značilnostih od IS predvsem po višji telesni teži in ITM.

ZAKLJUČKI

- Preiskovanke s SPO niso dosegle dovolj velike stopnje IR, da bi bil dosežen prag disfunkcije celic beta trebušne slinavke, ki bi povzročil prekomerno izločanje intaktnega proinsulina. Intaktni proinsulin ni dober označevalec za določanje insulinske rezistence pri preiskovankah s SPO.
- Med opazovanimi označevalci in kazalci smo dokazali, da sta HOMA_{IR} in Sib najzanesljivejša kazalca za določanje in spremljanje IR pri preiskovankah s SPO.
- Indeks IRIS II je bil manj senzitiven kot indeksa HOMA_{IR} in Sib.
- Ženske s SPO in IR se ločijo po kliničnih značilnostih od IS predvsem po višji telesni teži in ITM.

LITERATURA

1. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 853–61.
2. Azziz R, Woods KS, Reyna R, et al. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2745–9.
3. 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.
4. Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 50: 113–6.
5. Legro RS, Chiu P, Kunselman AR, et al. Polycystic ovaries are common in women with hyperandrogenic chronic anovulation but do not predict metabolic or reproductive phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2571–9.
6. Venkatesan AM, Dunaif A, Corbould A. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: progress and paradoxes. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56: 295–308.
7. Shoupe D, Kumar DD, Lobo RA. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 174: 588–92.
8. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, et al. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989; 38: 1165–74.
9. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997; 18: 774–800.

10. Barbieri RL, Hornstein MD. Hyperinsulinemia and ovarian hyperandrogenism. Cause and effect. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1988; 17: 685-703.
11. Moller DE, Flier JS. Insulin resistance-mechanisms, syndromes, and implications. *N Engl J Med* 1991; 325: 938-48.
12. Dunaif A, Segal KR, Shelley DR, et al. Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1992; 41: 1257-66.
13. Rosenbaum D, Haber RS, Dunaif A. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: decreased expression of GLUT-4 glucose transporters in adipocytes. *Am J Physiol* 1993; 264: 197-202.
14. Dunaif A, Xia J, Book CB, et al. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 1995; 96: 801-10.
15. Kauffman RP, Baker VM, Dimarino P, et al. Polycystic ovarian syndrome and insulin resistance in white and Mexican American women: a comparison of two distinct populations. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1362-9.
16. Meirrow D, Yossepowitch O, Rosler A, et al. Insulin resistant and non-resistant polycystic ovary syndrome represent two clinical and endocrinological subgroups. *Hum Reprod* 1995; 10: 1951-6.
17. Legro RS, Castracane VD, Kauffman RP. Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv* 2004; 59: 141-54.
18. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-9.
19. Pfutzner A, Kunt T, Hohberg C, et al. Fasting intact proinsulin is a highly specific predictor of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 682-7.
20. Ciampelli M, Leoni F, Cucinelli F, et al. Assessment of insulin sensitivity from measurements in the fasting state and during an oral glucose tolerance test in polycystic ovary syndrome and menopausal patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1398-406.
21. Forst T, Standl E, Hohberg C, et al. IRIS II study: the IRIS II score-assessment of a new clinical algorithm for classification of insulin resistance in patients Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2004; 21: 1149-53.
22. Barbieri RL, Makris A, Randall RW, et al. Insulin stimulates androgen accumulation in incubation of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 904-10.
23. Nestler JE. Role of hyperinsulinemia in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome, and its clinical implications. *Semin Reprod Endocrinol* 1997; 15: 111-22.
24. Dunaif A, Segal KR, Shelley DR, et al. Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1992; 41: 1257-66.
25. Magoffin DA, Weitsman SR. Differentiation of ovarian theca-interstitial cells in vitro: regulation of 17 alpha-hydroxylase messenger ribonucleic acid expression by luteinizing hormone and insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 1993; 132: 1945-51.
26. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16: 3-34.
27. Lanzone A, Fulghesu AM, Guido M, et al. Differential androgen response to adrenocorticotrophic hormone stimulation in polycystic ovarian syndrome: relationship with insulin secretion. *Fertil Steril* 1992; 58: 296-301.
28. Nestler JE, Powers LP, Matt DW, et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 83-9.
29. Legro RS, Finegood D, Dunaif A. A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2694-8.
30. Granberry MC, Fonseca VA. Insulin resistance syndrome: options for treatment. *South Med J* 1999; 92: 2-15.
31. Greenfield JR, Campbell LV. Insulin resistance and obesity. *Clin Dermatol* 2004; 22: 289-95.
32. Silfen ME, Denburg MR, Manibo AM, et al. Early endocrine, metabolic, and sonographic characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS): comparison between nonobese and obese adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4682-8.
33. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2548-56.
34. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004; 50: 1511-25.
35. Combs TP, Berg AH, Obici S, et al. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001; 108: 1875-81.
36. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, et al. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004; 291: 1730-7.
37. Pfutzner A, Pfutzner AH, Larbig M, et al. Role of intact proinsulin in diagnosis and treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Technol Ther* 2004; 6: 405-12.
38. Hedblad B, Nilsson P, Janzon L, et al. Relation between insulin resistance and carotid intima-media thickness and stenosis in non-diabetic subjects. Results from a cross-sectional study in Malmo, Sweden. *Diabet Med* 2000; 17: 299-307.
39. IBL Immuno-Biological Laboratories, Hamburg. Proinsulin ELISA: Instructions for use. Dosegljivo na: <http://www.idsltd.com/Downloads/CV-RE53031.pdf> (12.01.2007)