ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΝΙΚ. ΖΟΥΜΠΟΣ

«Μελέτη του βασικού μεταβολισμού, της αντίστασης στην ινσουλίνη και των πολυμορφισμών των α_{2B} και β_3 αδρενεργικών υποδοχέων, του γονιδίου του υποδοχέα της ινσουλίνης, του PPARγ γονιδίου και του γονιδίου του HSD17B5 σε Ελληνίδες με σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ Δ. ΣΑΛΤΑΜΑΥΡΟΥ

ΙΑΤΡΟΥ ΠΑΘΟΛΟΓΟΥ-ΔΙΑΒΗΤΟΛΟΓΟΥ

ΠΑΤΡΑ 2009

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΝΙΚ. ΖΟΥΜΠΟΣ

«Μελέτη του βασικού μεταβολισμού, της αντίστασης στην ινσουλίνη και των πολυμορφισμών των α_{2B} και β_3 αδρενεργικών υποδοχέων, του γονιδίου του υποδοχέα της ινσουλίνης, του PPARγ2 γονιδίου και του γονιδίου του HSD17B5 σε Ελληνίδες με σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ Δ. ΣΑΛΤΑΜΑΥΡΟΥ

ΙΑΤΡΟΥ ΠΑΘΟΛΟΓΟΥ-ΔΙΑΒΗΤΟΛΟΓΟΥ

ΠΑΤΡΑ 2009

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. κ. Κυριαζοπούλου Βενετσάνα, επιβλέπουσα Καθηγήτρια Ενδοκρινολογίας.
2. κ. Βαγενάκης Απόστολος, Καθηγητής Παθολογίας.
3. κ. Χριστόδουλος Φλωρδέλλης, Καθηγητής Φαρμακολογίας.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. κ. Κυριαζοπούλου Βενετσάνα, επιβλέπουσα Καθηγήτρια Ενδοκρινολογίας.
2. κ. Βαγενάκης Απόστολος, Καθηγητής Παθολογίας.
3. κ. Χριστόδουλος Φλωρδέλλης, Καθηγητής Φαρμακολογίας.
4. κ. Γώγος Χαράλαμπος, Καθηγητής Παθολογίας.
5. κ. Γεωργόπουλος Νεοκλής, Επίκ. Καθηγητής Αναπαραγωγικής Ενδοκρινολογίας
6. κ. Μάρκου Κωνσταντίνος, Επίκ. Καθηγητής Ενδοκρινολογίας.
7. κ. Παπαχατζοπούλου Αδαμαντία, Επικ. Καθηγήτρια Βιολογίας.

Στον Πατέρα μου που ταξίδεψε για τα όνειρα του

και στην Μητέρα μου για τις ευκαιρίες που δεν της δόθηκαν.

« ...συναψίες όλα και ούχ όλα, συμφερόμενον διαφερόμενον, συναίδον διαίδον, και εκ πάντων έν και εξ ενός πάντα. »

«... όλα είναι αλληλένδετα : τα σύνολα και τα μη-σύνολα, τα συγκλίνοντα και τα αποκλίνοντα, η συγχορδία και η μονωδία. Όλα συνταιριάζονται σε ένα, και από το ένα προέρχονται όλα. »

ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Για την συγγραφή της παρούσης διατριβής θέλω να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τον κ. Απόστολο Βαγενάκη, εμπνευσμένο Πανεπιστημιακό Δάσκαλό μου, ο οποίος με δίδαξε πρώτος την αγάπη για την Ιατρική και τον Ανθρωπο.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κ. Βενετσάνα Κυριαζοπούλου, η οποία υπήρξε πολύτιμη αρωγός σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου, τόσο για την συνεχή καθοδήγηση όσο και την αμέριστη συμπαράστασή της σε καθοριστικές παραμέτρους αυτής, όπως επίσης και τον κ. Αγαθοκλή Ψυρόγιαννη Διευθυντή του Διαβητολογικού Κέντρου του Π.Π.Γ.Ν. Ρίου, όπου εκπαιδεύθηκα για ένα χρόνο.

Ιδιαίτερη μνεία αξίζει να γίνει στον κ. Χριστόδουλο Φλωρδέλλη για τις επιστημονικές επισημάνσεις του και την στήριξη του Εργαστηρίου του και στην κ. Σωζάννα Κρητικού για την προσφορά της κατά την έναρξη της παρούσης διατριβής.

Θέλω να τονίσω την ουσιώδη συμβολή του κ. Νεοκλή Α. Γεωργόπουλου σε όλη αυτή την προσπάθεια, μέντορά μου στην έρευνα, ο οποίος πέραν του θέματος της παρούσης διατριβής, διέθεσε το έμψυχο υλικό ασθενών και μαρτύρων, με στήριξε, με καθοδήγησε και με ενέπνευσε σε κάθε βήμα μου όλα αυτά τα χρόνια. Σε αυτόν οφείλω την ενασχόληση με την έρευνα και είναι εκτός από δάσκαλος και μύστης στην Επιστήμη, ένας αγαπητός φίλος που σέβομαι και εκτιμώ απεριόριστα.

Η κ. Βασιλική Κόϊκα αποτέλεσε για εμένα μια σημαντική παρουσία και την ευχαριστώ για τις υποδείξεις της στην πρώτη επαφή μου με το Εργαστήριο.

Εκφράζω θερμές ευχαριστίες στην κ. Δήμητρα Μαριόλη για την συμβο
λή της, τόσο στο Εργαστήριο, όσο και για τις χρήσιμες συμβουλές της στην συγγραφή αυτού του πονήματος.

Αισθάνομαι τυχερός για την συνεργασία μου με την κ. Βασιλική Βερβίτα, η οποία βοήθησε στη συλλογή όλων των δεδομένων των ασθενών και μαρτύρων του Ιατρείου Αναπαραγωγικής Ενδοκρινολογίας της Μαιευτικής - Γυναικολογικής Κλινικής του Π.Π.Γ.Ν. Ρίου.

Τέλος, θα ήταν παράλειψή μου να μην αναφερθώ στην βοήθεια του αδελφικού μου φίλου κ. Γεωργίου Πανόπουλου στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της έρευνάς μου, καθώς και στον κ. Φώτη Παλαιολόγο για την προσφορά του στην τελική διαμόρφωση του κειμένου.

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. Σύνδρομο των Πολυκυστικών Ωοθηκών (PCOS).

1. Ορισμός..... Σελ. 2

2. Ιστορική Αναδρομή..... Σελ. 3

3. Συχνότητα..... Σελ. 5

4. Κλινική Εικόνα..... Σελ. 6

5. Υπερτρίχωση..... Σελ. 6

6. Ακμή..... Σελ. 8

7. Αλωπεκία ανδρικού τύπου..... Σελ. 9

8. Μελανίζουσα Ακάνθωση..... Σελ. 10

9. Φυσιολογική παραγωγή και ρύθμιση των ανδρογόνων... Σελ. 11

10. Βιοσύνθεση των ανδρογόνων..... Σελ. 12

11. Φυσιολογική ρύθμιση της παραγωγής ανδρογόνων..... Σελ. 13

12. Ωοθήκη..... Σελ. 14

13. Επινεφρίδια..... Σελ. 18

14. Περιφερικός μεταβολισμός των εκκρινομένων προμορίων..... Σελ. 20

Β. Παθογένεια του PCOS.

1. Η Ωοθηκική λειτουργία στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών..... Σελ. 21

2. Δυσλειτουργία κυττάρων θήκης..... Σελ. 22

3. Δυσλειτουργία των κοκκιωδών κυττάρων..... Σελ. 25

4. Παράγοντες απο το ωοκύτταρο..... Σελ. 27

5. Εξωοθηκικοί παράγοντες..... Σελ. 27

α. Ινσουλίνη..... Σελ. *27*

β. Προφλεγμονώδεις Κυττοκίνες..... Σελ. 28

γ. Διαταραχές του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση..... Σελ. 29

6. Παθογένεια της ωοθηκικής δυσλειτουργίας..... Σελ. 31

7. Επινεφριδιακή Υπερανδρογοναιμία..... Σελ. 33

8. Ο ρόλος του διαταραγμένου περιφερικού μεταβολισμού.. Σελ. 37

Γ. Γενετική PCOS.

1. Οικογενειακή κατανομή του συνδρόμου..... Σελ. 38

2. Υποψήφια γονίδια για το PCOS..... Σελ. 40

α. Γονίδια αφορώντα στην ωοθηκική και

επινεφριδιακή στεροειδογένεση..... Σελ. 40

β. Γονίδιο CYP11α ..... Σελ. 42

γ. Γονίδιο CYP21..... Σελ. 43

δ. Γονίδιο CYP17..... Σελ. 44

ε. Γονίδιο CYP19..... Σελ. 46

στ. Γονίδιο HSD17B ..... Σελ. 47

3. Γονίδια σχετιζόμενα με ορμονικά αποτελέσματα των

στεροειδών ορμονών..... Σελ. 48

α. Γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων..... Σελ. 48

β. Γονίδιο της SHBG..... Σελ. 49

4. Γονίδια αφορώντα στην δράση και ρύθμιση των

γοναδοτροπινών..... Σελ. 51

α. Η LH και τα γονίδια των υποδοχέων..... Σελ. 51

5. Γονίδιο της Φολλιστατίνης..... Σελ. 53

6. Γονίδια εμπλεκόμενα στην έκκριση και δράση της ινσουλίνης..... Σελ. 54

α. Γονίδιο της ινσουλίνης..... Σελ. 55

β. Γονίδιο του υποδοχέα της ινσουλίνης (INSR)..... Σελ. 57

γ. Πρωτεΐνες του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS) ..... Σελ. 59

δ. Γονίδιο της καλπαΐνης 10 (Calpain 10)..... Σελ. 60

7. Γονίδια αφορώντα στην ενεργειακή ομοιοστασία, σχετιζόμενα με το PPARγ..... Σελ. 61

α. Τα γονίδια της λεπτίνης, του υποδοχέα αυτής και της αδιπονεκτίνης..... Σελ. 61

8. Γονίδιο του PPARγ..... Σελ. 62

Δ. Μέθοδοι χρησιμοποιούμενες σε γενετικές μελέτες. Σελ. 63

Ε. Μεταβολικό Σύνδρομο, PCOS και επιπλοκές.

1. Ορισμός μεταβολικού συνδρόμου..... Σελ. 65

2. Μεταβολικό σύνδρομο και PCOS..... Σελ. 66

3. Διάγνωση της αντίστασης στην ινσουλίνη..... Σελ. 71

ΣΤ. PCOS, Αντίσταση στην ινσουλίνη και επιπλοκές

1. Αντίσταση στην ινσουλίνη και αύξηση του κινδύνου για σακχαρώδη διαβήτη..... Σελ. 73

2. Αντίσταση στην ινσουλίνη και αύξηση του κινδύνου αθηροσκλήρωσης..... Σελ. 73

3. Η σημασία της αντίστασης στην ινσουλίνη στο PCOS.... Σελ. 75

4. Μεταβολισμός και αναπαραγωγή : Σύνδρομο XX..... Σελ. 76

Ζ. Αδρενεργικοί Υποδοχείς..... Σελ. 79

Ε Ι Δ Ι Κ Ο Μ Ε Ρ Ο Σ

Α. Σκοπός της Μελέτης..... Σελ. 84

Β. Ασθενείς και Μέθοδοι..... Σελ. 85

1. Πληθυσμός της μελέτης..... Σελ. 85

2. Μέθοδοι μέτρησης κλινικών χαρακτηριστικών..... Σελ. 85

3. Μοριακές μέθοδοι..... Σελ. 87

α. Αναζήτηση και ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μέσω χρήσης λογισμικών προγραμμάτων..... Σελ. 87

β. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό ανθρώπινο αίμα..... Σελ. 88

γ. Γονίδιο του αδρενεργικού υποδοχέα α_{2B}..... Σελ. 94

δ. Γονίδιο HSD17B5..... Σελ. 95

ε. Γονίδιο του PPARγ2 ..... Σελ. 96

4. Στατιστική ανάλυση..... Σελ. 97

Γ. Αποτελέσματα.

1. Γονίδιο του αδρενεργικού υποδοχέα α_{2B}..... Σελ. 98

2. Γονίδιο HSD17B5..... Σελ. 100

3. Γονίδιο του PPARγ2 και IRS-1..... Σελ. 104

Δ. Συζήτηση.

1. Γονίδιο του αδρενεργικού υποδοχέα $\alpha_{2B,}\beta_3$ ..... Σελ. 108

2. Γονίδιο HSD17B5..... Σελ. 110

3. Γονίδιο του PPARγ2 και IRS-1..... Σελ. 116

Β Ι Β Λ Ι Ο Γ Ρ Α Φ Ι Α ..... Σελ. 123

Π Α Ρ Α Ρ Τ Η Μ Α – Δ Η Μ Ο Σ Ι Ε Υ Σ Ε Ι Σ..... Σελ. 180

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. Σύνδρομο των Πολυκυστικών Ωοθηκών (PCOS).

1. Ορισμός.

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών χαρακτηρίζεται από χρόνια ολιγο- ή ανοωθυλακιορρηξία, βιοχημική υπερανδρογοναιμία ή υπερανδρογονισμό (κλινικές εκδηλώσεις υπερανδρογοναιμίας με φυσιολογικά επίπεδα ανδρογόνων ορού) και παρουσία χαρακτηριστικών υπερηχογραφικών ευρημάτων πολυκυστικής μορφολογίας των ωοθηκών με αποκλεισμό άλλων γνωστών διαταραχών που προκαλούν υπερανδρογοναιμία (1). Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών αποτελεί ετερογενή διαταραχή με ωοθηκική και, ενδεχομένως, επινεφριδιακή υπερανδρογοναιμία, ταυτόχρονα με διαταραχές της έκκρισης των γοναδοτροπινών και του μεταβολισμού. Η διάγνωση τίθεται εξ'αποκλεισμού. Η αύξηση των ανδρογόνων δίνει τον ορισμό του συνδρόμου, ο οποίος παρέχει τη δυνατότητα εμφάνισης ευρέος φάσματος κλινικών εκδηλώσεων και φαινοτύπων. Τα τελευταία 40 χρόνια έχουν δημοσιευθεί για το PCOS 84.000 σχετικά άρθρα με 500.000, περίπου σελίδες, γεγονός που υποδεικνύει τη αδυναμία μας για βαθύτερη κατανόηση του συνδρόμου. Ακόμα και ο ορισμός του σαν σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών δεν είναι ορθός μιά και η λέξη σύνδρομο σημαίνει σύνολο συμπτωμάτων που σχετίζονται με την ίδια κλινική εικόνα και της οποίας η αιτιολογία ή παθογένεια, δεν είναι γνωστές με βεβαιότητα. Πρόκειται για ομάδα συμπτωμάτων που παρουσιάζονται ταυτόχρονα ή για σύνολο συμπτωμάτων που σχετίζονται το ένα με το άλλο, γεγονός που δεν ισχύει για το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

2. Ιστορική αναδρομή.

Το **1935**, οι Stein και Leventhal (2) ανέφεραν σε ένα σεμινάριο ότι οι πολυκυστικές ωοθήκες, τις οποίες είχαν ήδη περιγράψει το **1844** οι Chereau (3) και Rokitansky (4), συνδέονται με την αμηνόρροια. Από τις επτά γυναίκες που παρουσίασαν, οι τέσσερεις εμφάνιζαν υπερτρίχωση (η μια ήταν παχύσαρκη),οι τρεις ήταν παχύσαρκες και η μια είχε αμηνόρροια. Όλες εμφάνιζαν πολυκυστική μορφολογία στις ωοθήκες κάνοντας ήδη εμφανή την ετερογένεια του συνδρόμου. Η εξαίρεση τμήματος της ωοθήκης, με κωνοειδή εκτομή, οδηγούσε σε αποκατάσταση της γονιμότητας στην πλειονότητα των γυναικών με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Σημαντικοί ιστορικοί σταθμοί στη διάγνωση και κατανόηση της αιτιοπαθογένειας της νόσου υπήρξαν το **1950** η πρώτη αναγνώριση των βιοχημικών διαταραχών (αυξημένα επίπεδα LH στα ούρα), το **1970** η ανεύρεση διαταραχών στην έκκριση FSH, LH και το **1980** η τεκμηρίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη που συνοδεύει συχνά το σύνδρομο.

Οι ονομασίες που δόθηκαν στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών είναι ποικίλες, και προσπαθούν να καλύψουν ένα ευρύ φάσμα των εκδηλώσεων, όπως σύνδρομο Stein-Leventhal, πολυκυστική ωοθήκη, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, νόσος πολυκυστικών ωοθηκών καθώς και σύνδρομο χρόνιας υπερανδρογοναιμικής ανωοθυλακιορρηξίας, λειτουργική ωοθηκική υπερανδρογοναιμία και υπερανδρογοναιμική χρόνια ανωοθυλακιορρηξία.

Η διατλαντική διαφωνία, όσον αφορά τα διαγνωστικά κριτήρια του PCOS, αντανακλάται στη σημασία που δίνουν οι γιατροί στα κλινικά, ενδοκρινικά και υπερηχογραφικά ευρήματα. Σύμφωνα με τα κριτήρια που τέθηκαν το **1990** (National Institute of Health/National Institutes of Child Health and Human Development), η διάγνωση του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών πρέπει να τίθεται όταν συνυπάρχουν χρόνια ολιγο- ή ανωοθυλακιορρηξία και βιοχημική υπερανδρογοναιμία ή υπερανδρογονισμός, ύστερα από τον αποκλεισμό των άλλων γνωστών αιτίων που προκαλούν αυτές τις διαταραχές (5). Στα αίτια αυτά υπάγονται η συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων όψιμης έναρξης, το σύνδρομο Cushing, η πρώιμη ωοθηκική ανεπάρκεια, η παχυσαρκία, οι αρρενοποιητικοί όγκοι των ωοθηκών και των επινεφριδίων, η υπερπρολακτιναιμία, ο υποθυρεοειδισμός, η μεγαλακρία και διάφορα φάρμακα.

Τα κριτήρια του **1990** αναθεωρήθηκαν το **2003** από το Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group (6, 7). Σύμφωνα με τα κριτήρια αυτά, η διάγνωση του PCOS τίθεται όταν η γυναίκα εμφανίζει δύο από τα τρία συμπτώματα ή ευρήματα, που είναι η χρόνια ολιγο- ή ανωοθυλακιορρηξία, η βιοχημική υπερανδρογοναιμία ή ο υπερανδρογονισμός και η πολυκυστική μορφολογία των ωοθηκών (όγκος της μιας ή και των δύο ωοθηκών>10cm^3, αριθμός μικρών ωοθυλακίων διαμέτρου 2-8 mm ≥ 12 στη μία ή και στις δύο ωοθήκες). Για τη διάγνωση του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών και με τα κριτήρια αυτά, πρέπει να αποκλεισθούν τα γνωστά αίτια που προκαλούν χρόνια ανωοθυλακιορρηξία και υπερανδρογοναιμία. Τα κριτήρια αυτά δεν έχουν παγκόσμια αποδοχή,

ιδιαίτερα στις ΗΠΑ, όπου ο ρόλος των υπερηχογραφικών ευρημάτων αμφισβητείται όλο και συχνότερα τα τελευταία χρόνια (8).

3. Συχνότητα.

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών είναι ίσως η συχνότερη διαταραχή των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Προσβάλλει το 1-5% του γενικού πληθυσμού. Η συχνότητα εξαρτάται από εθνικούς και φυλετικούς παράγοντες. Διάφορες μελέτες έχουν δημοσιευθεί για τη συχνότητα του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών, σύμφωνα με μια έρευνα που έγινε από τον Knochenhauer το 1998 στις ΗΠΑ εμφανίζεται με ποσοστό 4,7% στις Καυκάσιες και 3,4% σε Εγχρωμες γυναίκες (9), για την Ελλάδα υπάρχει μόνο η μελέτη στη Λέσβο το 1999 από την Ευανθία Διαμαντή-Κανδαράκη και τους συνεργάτες της και βρέθηκε ότι αποτελεί το 6,77% του πληθυσμού (10), στη Μαδρίτη το 2000 από την Asuncion et al αποτελεί το 6,5% του πληθυσμού (11) ενώ το 2004 στις ΗΠΑ καταγράφηκε από τον Azziz με ποσοστό 6,6% (12). Το συνδρόμο των πολυκυστικών ωοθηκών προσβάλλει το 5-10% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας και το 20-50% των ανωοθυλακιορρηκτικών υπογόνιμων γυναικών και αποτελεί την συχνότερη αιτία ανωοθυλακιορρηκτικής υπογονιμότητας και υπερανδρογοναιμίας (13).

4. Κλινική εικόνα.

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών παρουσιάζεται συνήθως την περίοδο της εφηβείας, κοντά στην εμμηναρχή. Είναι ένα ετερογενές σύνδρομο με ευρύ κλινικό φάσμα . Οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου είναι η υπερανδρογοναιμία και η χρόνια ανωοθυλακιορρηξία, ενώ σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη (14), την αντισταθμιστική υπερινσουλιναιμία και τη δυσανεξία στη γλυκόζη (14). Η υπερανδρογοναιμία ευθύνεται για την υπερτρίχωση, την ακμή, τη λιπαρότητα του δέρματος, την αλωπεκία ανδρικού τύπου, τη μελανίζουσα ακάνθωση και ενδέχεται να ευθύνεται για την αύξηση του βάρους του σώματος που παρατηρείται στο 50% των περιπτώσεων. Η αντίσταση στην ινσουλίνη αποτελεί πρωταρχικό παράγοντα για την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, υπέρτασης και καρδιαγγειακής νόσου. Η ανωοθυλακιορρηξία μπορεί να παρουσιαστεί σε γυναίκες με διαταραχές της εμμήνου ρύσεως, με υπογονιμότητα αλλά και σε γυναίκες με φυσιολογικούς εμμηνορυσιακούς κύκλους.

5. Υπερτρίχωση.

Μια από τις κύριες εκδηλώσεις της υπερανδρογοναιμίας είναι η υπερτρίχωση. Παρά ταύτα πολλές φορές δεν αξιολογείται σωστά, καθώς πολλοί γιατροί χρησιμοποιούν υποκειμενικά κριτήρια αξιολόγησης, ενώ πολλές φορές οι ίδιες οι γυναίκες προχωρούν σε κοσμητικές παρεμβάσεις που δυσκολεύουν το έργο της αξιολόγησης. Η υπερτρίχωση είναι η ανάπτυξη τριχών σε

ανδρογονοεξαρτώμενες περιοχές του σώματος της γυναίκας. Η υπερτρίχωση εμφανίζεται στο πρόσωπο και συγκεκριμένα στο άνω χείλος, τις παρειές, στο πηγούνι, στο στέρνο, καθώς και υπερηβικά, στην οσφύ και στην έσω επιφάνεια των μηρών και στο βραχίονα. Ο βαθμός της υπερτρίχωσης υπολογίζεται από το Ferriman-Gallwey score (15). Σε εννιά περιοχές του προσώπου και του σώματος συναθροίζεται η πυκνότητα της τριχοφυίας και η ύπαρξη και το μήκος των τελικών τριχών και βαθμολογείται από το 0 (καμία τελική τρίχα) μέχρι το 4 (πυκνή τριχοφυία). Η βαθμολόγηση μέχρι το 8 θεωρείται φυσιολογική. Ενδεχομένως να επηρεάζεται από φυλετικούς παράγοντες αφού παρατηρήθηκε ότι η συχνότητα υπερτρίχωσης είναι μικρότερη στην Ιαπωνία από ότι σε έθνη με πιο σκούρο χρώμα (16). Ο δείκτης Ferriman–Gallwey με βαθμολόγηση 6, 8 and 10 σε γενικό γυναικείο πληθυσμό ήταν.0, 2.8 and 1.6% σε λευκές γυναίκες και 7.1, 6.1 and 2.1% αντίστοιχα σε μαύρες (12). Ο μηχανισμός που οδηγεί στην υπερτρίχωση δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως αλλά σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει η τοπική αύξηση της διύδροτεστοστερόνης και ιδίως η αύξηση των επιπέδων της 5α –αναγωγάσης και της 3α –ανδροστενεδιόνης (17). Η υπερτρίχωση μπορεί να εμφανίζεται σαν η μόνη κλινική εκδήλωση της υπερανδρογοναιμίας ή να συνυπάρχει με την ακμή, τη γυρεοειδή αλωπεκία και τη χρόνια ανωοθυλακιορρηξία. Η παχυσαρκία και η αντίσταση στην ινσουλίνη επιδεινώνουν τη κλινική εικόνα της υπερτρίχωσης. Η ινσουλίνη επάγει την ωοθηκική παραγωγή ανδρογόνων μέσω της LH, μειώνει την ηπατική παραγωγή SHBG, και επάγει την ανάπτυξη του θύλακα της τρίχας στο δέρμα. Συνεπώς οι παχύσαρκες γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και αντίσταση στην ινσουλίνη παρουσιάζουν συχνότερα υπερτρίχωση.

Η παρουσία σημείων βαρειάς υπερανδρογοναιμίας όπως η κλειτοριδομεγαλία, η βαριά αλωπεκία ανδρικού τύπου και η συνολική αρρενοποίηση του σώματος παραπέμπουν σε πιθανή παρουσία αρρενοποιητικού όγκου, συνδρόμου HAIR-AN syndrome ή συγγενούς υπερπλασίας επινεφριδίων. Στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών η ωοθήκη είναι η κύρια πηγή παραγωγής των ανδρογόνων και δευτερευόντως το επινεφρίδιο.

6. Ακμή.

Η ακμή είναι συχνή δερματική εμφάνιση της υπερανδρογοναιμίας, παρούσα περίπου στο 1/3 των γυναικών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (18). Η κοινή ακμή είναι πάθηση του τριχοσμηγματικού συστήματος και χαρακτηρίζεται από πολύμορφο εξάνθημα το οποίο αποτελείται από φαγέσωρες, βλατίδες, φλύκταινες, οζίδια, κύστεις και ουλές στο πρόσωπο, στους ώμους και στη ράχη. Η υπερανδρογοναιμία του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών είναι δυνατόν να συμβάλλει στην εμφάνιση όλων των μορφών της κοινής ακμής καθώς απασχολεί σύμφωνα με έρευνες το 20-40% των γυναικών με ακμή χωρίς υπερτρίχωση και χωρίς διαταραχές εμμήνου ρύσης (19). Εν τούτοις, η υπερανδρογοναιμία δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση της ακμής και οι σχετικές κλινικές μελέτες δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα (20, 21). Άλλη εκδήλωση της υπερανδρογοναιμίας είναι η λιπαρότητα του δέρματος. Η έκκριση των ανδρογόνων διεγείρει την αυξημένη παραγωγή σμήγματος, υλικού πλούσιου σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, τριγλυκερίδια και σκουαλένιο.Η λιπαρότητα

θεωρείται αληλένδετη με την ακμή αφού είναι συνηθισμένο φαινόμενο η λιπαρότητα του δέρματος να εξελίσσεται αργότερα σε θυλακίτιδα και ακμή (22). Η ακμή, η λιπαρότητα του δέρματος και η τριχόπτωση αξιολογούνται με τη μέθοδο Cremoncini (23)

7. Αλωπεκία ανδρικού τύπου.

Η αλωπεκία ανδρικού τύπου είναι η απόπτωση των τριχών της κεφαλής και γίνεται ορατή στην πρόσθια βρεγματική χώρα αρχίζοντας σαν τριγωνική λεπτή πλάκα με οπισθιο-πλάγια επέκταση στη στεφάνη (17).Η τεστοστερόνη ή διυδροτεστοστερόνη συνδέεται με κυτταροπλασματικούς υποδοχείς στα κύτταρα των θυλάκων των τριχών προκαλώντας μεταβολή της τεταρτογενούς διαμόρφωσης του μορίου των υποδοχέων, ακολουθεί σύνδεση με ειδικά τμήματα του DNA που οδηγεί σε διακοπή του αναγεννώντος σταδίου ανάπτυξης των τριχών, τη μετάπτωση τους σε τελογενές στάδιο προκαλώντας έτσι την αδυναμία πάχυνσης και αύξησης των τριχών με αποτέλεσμα την απόπτωση τους.

Η πλειοψηφία των γυναικών με αλωπεκία ανδρικού τύπου πάσχουν από σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Σε γυναίκες μικτής εθνικής προέλευσης με κυρίαρχο σύμπτωμα την αλωπεκία ανδρικού τύπου η συχνότητα του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών ήταν 67% σε σχέση με 27% στην ομάδα ελέγχου(24). Η απώλεια της τριχοφυίας είναι προοδευτική και πιθανώς υποδιαγνώσκεται σε γυναίκες με PCOS (17). Η αλωπεκία δεν αποτελεί σημαντικό δείκτη του συνδρόμου εκτός και αν συνυπάρχει υπερανδρογοναιμία (17), ενώ πολλές φορές καθώς χρειάζεται πολύ χρόνο για

τη πλήρη κλινική της εκδήλωση συχνά υποδιαδιγνώσκεται στις γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (25).

8. Μελανίζουσα ακάνθωση.

Η μελανίζουσα ακάνθωση είναι μια δερματική εκδήλωση που χαρακτηρίζεται από υπερκεράτωση και καφεοειδή ή μελανίζουσα υπέρχρωση του δέρματος, το οποίο καλύπτεται από θηλωματώδεις προσεκβολές, που του προσδίδουν βελούδινη υφή. Παρατηρείται κυρίως στις πτυχές του αυχένα και της μασχάλης, στους αγκώνες, τα γόνατα και στην εσωτερική επιφάνεια των μηρών (17). Η καλοήθης μορφή της μελανίζουσας ακάνθωσης συνυπάρχει με το σύνδρομο της αντίστασης στην ινσουλίνη, εμφανίζεται στο 5-10% των γυναικών με φυσιολογικό BMI και στο 50% των παχύσαρκων γυναικών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (17).

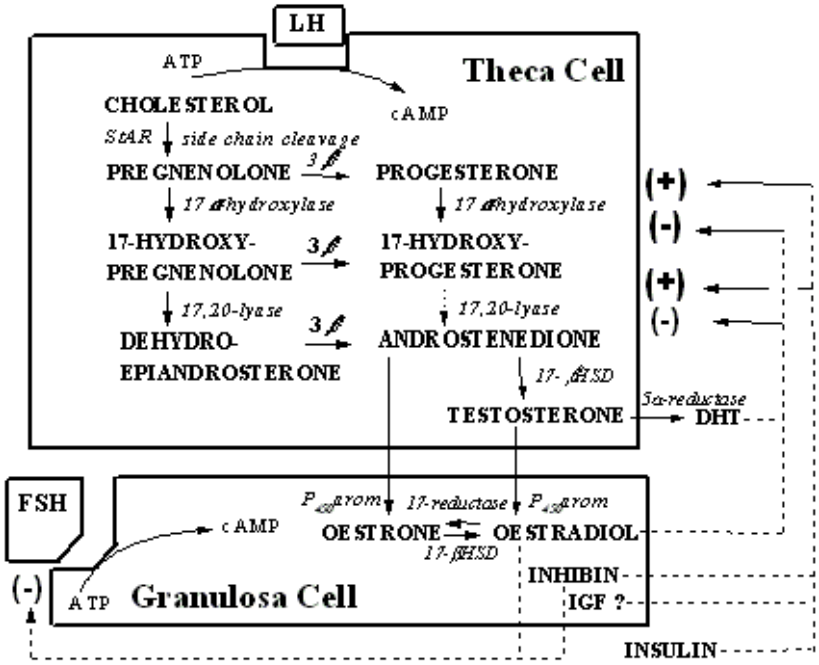
Οι διαταραχές της εμμήνου ρύσεως είναι ποικίλες και περιλαμβάνουν την ολιγομηνόρροια, τις δυσλειτουργικές αιμορραγίες της μήτρας, τη δευτεροπαθή αμηνόρροια, και την πρωτοπαθή αμηνόρροια. Οι διαταραχές της εμμήνου ρύσεως συνήθως εμφανίζονται από την εμμηναρχή. Η ολιγοανωοθυλακιορρηξία, η οποία αποτελεί μια από τις συχνότερες εκδηλωσεις του συνδρόμου, οδηγεί σε υπογονιμότητα και εμφανίζεται τόσο στις γυναίκες με διαταραχές εμμήνου ρύσεως όπως επίσης και στις γυναίκες με φυσιολογικούς εμμηνορυσιακούς κύκλους (25). Στον υπερηχογραφικό έλεγχο η κλασσική πολυκυστική μορφολογία των ωοθηκών απεικονίζεται με 12 ή περισσότερα ωοθυλάκια διαμέτρου 2-9 mm, με αυξημένο ωοθηκικό στρώμα, στην μια ή και τις δύο ωοθήκες και με όγκο μεγαλύτερο από 10 ml

(6,7). Ωστόσο τα μορφολογικά ευρήματα ποικίλουν και οι ωοθήκες μπορεί να παρουσιάζονται διογκωμένες χωρίς κυστικά ωοθυλάκια ή με φυσιολογικό μέγεθος με κυστικά ωοθυλάκια ή ακόμα και με φυσιολογικό μέγεθος χωρίς κυστικά ωοθυλάκια.

Η παχυσαρκία είναι ανδροειδούς τύπου και εμφανίζεται με την αύξηση της εναπόθεσης του σπλαχνικού λίπους. Παρατηρείται στο 50% των γυναικών με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (14). Εκδηλώνεται περιστασιακά στο μέσον της παιδικής ηλικίας και υπολογίζεται από τη σχέση μέσης-ισχίου και εφόσον η σχέση αυτή είναι μεγαλύτερη από 88 εκατοστά η ασθενής θεωρείται παχύσαρκη (17). Η παχυσαρκία συμβάλλει στην αύξηση της αντίστασης στην ινσουλίνη, στη δυσανεξία στη γλυκόζη, στη δυσλιπιδαιμία και στην αύξηση της παραγωγής των ανδρογόνων που παρατηρείται με την αύξηση των επιπέδων της τεστοστερόνης και της οιστραδιόλης.

9. Φυσιολογική παραγωγή και ρύθμιση των ανδρογόνων.

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών είναι η πρωτογενής μορφή της χρόνιας ανωοθυλακιορρηξίας μαζί με υπερανδρογοναιμία. Παρά τη σωρεία ερευνητικών μελετών, η βάση της υπερανδρογοναιμίας παραμένει μυστήριο. Σειρά δεδομένων δείχνουν ότι το PCOS είναι αποτέλεσμα μη αναγνωρίσιμου τύπου διαταραχής τόσο στη σύνθεση (στεροειδογένεση) όσο και στην έκκριση των ανδρογόνων. Ως υπόβαθρο για την κατανόηση της ωοθηκικής και επινεφριδιακής λειτουργίας στο PCOS παρατίθεται η φυσιολογία των ανδρογόνων.



***Εικόνα 1** : Βιοσυνθετικές οδοί των στεροειδών ορμονών, σύμφωνα με το μοντέλο των δύο κυττάρων της ωοθηκικής στεροειδογένεσης.*

10. Βιοσύνθεση των ανδρογόνων.

Οι ωοθήκες και τα επινεφρίδια μοιράζονται από κοινού την οδό της βιοσύνθεσης των στεροειδικών ορμονών **(Εικόνα 1).** Το αρχικό βήμα της βιοσύνθεσης όλων των στεροειδικών ορμονών είναι η μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη. Αυτή είναι μια διαδικασία δύο βημάτων. Η ταχύτητα της διαδικασίας εξαρτάται από την μεταφορά της χοληστερόλης από την εξωτερική στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (26). Η πρεγνενολόνη ακολούθως υφίσταται μια μετατροπή δύο βημάτων σε 17-κετοστεροειδική δευδροεπιανδροστερόνη (DHEA). Αυτή η μετατροπή επιτυγχάνεται μέσω του κυτοχρώματος P450c17. Το P450c17 είναι ένα ένζυμο με ιδιότητες τόσο της 17-υδροξυλάσης όσο και της 17,20 λυάσης με το πρώτο να είναι περισσότερο

αποτελεσματικό από το δεύτερο (27). Η προγεστερόνη υφίσταται ένα παράλληλο μετασχηματισμό σε ανδροστενεδιόνη. Η 17-υδροξυλίωση επιτυγχάνεται μέσω του P450c17, αλλά στους ανθρώπους η ποσοτική σημασία στην δραστικότητα της 17,20 λυάσης είναι άγνωστη. Το παράγωγο του γονιδίου P450c17 δεν χρησιμοποιεί ικανοποιητικά την 17-υδροξυπρογεστερόνη ως υπόστρωμα, έτσι το P450c17 δεν φαίνεται να επηρεάζει την δραστικότητα της 17,20λυάσης (28). Υπάρχουν κάποια στοιχεία που υποστηρίζουν την ύπαρξη ανεξαρτήτου P450c17 μονοπατιού (27). Ο μεταβολισμός των Δ5-3β-υδροξυστεροειδών σε στεροειδή με τον Δ4-3-κετο μετασχηματισμό επιτυγχάνεται από την Δ5-ισομεράση-3β- υδροξυστεροειδική δευδρογενάση (3β). Ο τύπος ΙΙ του ισοενζύμου 3β αποτελεί την μεγάλη πλειοψηφία της 3β δραστικότητας στις ανθρώπινες ωοθήκες και στα επινεφρίδια (29). Στα επινεφρίδια, η 17 υδροξυπρογεστερόνη καταλύει ένα κομβικό σημείο της βιοσύνθεσης των ορμονών του φύλου και της κορτιζόλης. Όταν η 17-υδροξυπρογεστερόνη υποστεί υδροξυλίωση στην 21^{η} θέση ακολουθεί το μονοπάτι της κορτιζόλης) ενώ όταν υποστεί 17,20-λύση ακολουθεί το μονοπάτι των 17-κετοστεροειδών. Η μετατροπή των 17-κετοστεροειδών σε 17β-υδροξυστεροειδή από την 17β-υδροξυστεροειδική δευδρογενάση είναι σημαντική για το σχηματισμό των δυναμικών στεροειδών του φύλου, της τεστοστερόνης, της δευδροτεστοστερόνης και της οιστραδιόλης.

11. Φυσιολογική Ρύθμιση της παραγωγής ανδρογόνων.

Τα ανδρογόνα του πλάσματος παράγονται άμεσα μέσω της

στερεοειδογένεσης και έμμεσα από τον περιφερικό μεταβολισμό των εκκρινόμενων προδρομικών ουσιών. Τα ανδρογόνα και τα πρόδρομα μόρια τους εκκρίνονται από τα ωάρια και τα επινεφρίδια ως απάντηση στις αντίστοιχες τροφικές υποφυσιακές ορμόνες, την ωχρινοτρόπο (LH) και την φλοιοεπινεφριδιοτρόπο ορμόνη (ACTH). Ειδικά τα ανδρογόνα στις γυναίκες δεν βρίσκονται κάτω από έλεγχο μίας αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (feedback) από αυτές τις υποφυσιακές ορμόνες, επειδή είναι παραπροϊόντα της έκκρισης οιστραδιόλης και κορτιζόλης. Το καθοριστικό βήμα για τον ρυθμό παραγωγής στην στεροειδογένεση είναι ο σχηματισμός της πρεγνενολόνης από τη χοληστερόλη, βήμα το οποίο ρυθμίζεται από τις τροφικές ορμόνες. Το καθοριστικό βήμα για τον περιορισμό στον ρυθμό παραγωγής ανδρογόνων είναι η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του P450c17. Η έκφραση του γονιδίου του P450c17 εξαρτάται απόλυτα από την συγκέντρωση των τροφικών ορμονών, της LH στις ωοθήκες (30) και της ACTH στο φλοιό των επινεφριδίων (31). Η δραστικότητα της 17,20 λυάσης του P450c17 ρυθμίζεται εκλεκτικά μέσω της αληλλοεπίδρασης με ένζυμα δότες ηλεκτρονίων καθώς και μέσω φωσφορυλίωσης της σερίνης (32). Επιπροσθέτως η στεροειδογενής απάντηση σε ACTH και LH τροποποιείται από μια πληθώρα μικρών πεπτιδίων μεταξύ των οποίων σημαντική θέση έχουν η ινσουλίνη και οι αυξητικοί παράγοντες της (IGFs).

12. Ωοθήκη.

Η ρύθμιση της ενδοωοθηκικής συγκέντρωσης ανδρογόνων είναι σημαντική στην ωοθηκική λειτουργία. Τα ανδρογόνα είναι "αναγκαίο κακό" για τις

ωοθήκες. Από την μια πλευρά τα ανδρογόνα είναι υποχρεωτικά απαραίτητα υποστρώματα για την βιοσύνθεση της οιστραδιόλης και από την άλλη πλευρά προάγουν την αύξηση των μικρών ωοθυλακίων (33). Όταν όμως είναι σε περίσσεια φαίνεται ότι παρεμβαίνουν τόσο στη διαδικασία ωρίμανσης των ωοθυλακίων, εμποδίζοντας την εμφάνιση του κυρίαρχου ωοθυλακίου και οδηγόντας το σε ατρησία (33) όσο και στην δράση της LH στην ωχρινοποίηση των κοκκιοειδών (granulosa) κυττάρων (34). Επομένως, η σύνθεση των ανδρογόνων πρέπει να κρατηθεί στο ελάχιστο απαραίτητο επίπεδο ώστε να ευοδωθεί η ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Αυτό σημαίνει ότι η σύνθεση των ωοθηκικών ανδρογόνων πρέπει να συντονίζεται με τις ανάγκες του ωοθυλακίου.

Η φυσιολογική ωοθηκική λειτουργία εξαρτάται από την συνδυασμένη δράση της LH στα ενδιάμεσα στρωματικά κύτταρα θήκης (theca-interstitial-stromal) και της FSH στα κοκκιώδη (granulosa) κύτταρα (27). Σύμφωνα με το μοντέλο 2 κυττάρων της ωοθηκικής λειτουργίας (**Εικόνα 1**) η στεροειδογένεση στό μέσο της ωοθηκικής φάσης οργανώνεται έτσι ώστε το τμήμα κύτταρων θήκης εκκρίνει ανδροστενεδιόνη σε απάντηση στην LH και η ανδροστενεδιόνη η οποία σχηματίζεται από τα κύτταρα θήκης μετατρέπεται μέσα στα κοκκιώδη κύτταρα σε οιστρογόνα από την αρωματάση υπό την επίδραση της FSH. Καθώς εμφανίζεται το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, εκκρίνονται αυξημένα ποσά ανδροστενεδιόνης και οιστραδιόλης με προεξάρχουσα την οιστραδιόλη. Η έκκριση της LH και ακολούθως η έκκριση των ανδρογόνων δεν είναι πολύ ευαίσθητη στην αρνητική επανατροφοδότηση (negative feedback) από τις μέτριες αλλαγές των επιπέδων οιστραδιόλης ή τεστοστερόνης στο πλάσμα που συμβαίνουν κατά την διάρκεια ενός φυσιολογικού κύκλου εμμήνου

ρύσεως.

Η ενδοωοθηκική ρύθμιση της σύνθεσης ανδρογόνων ως απάντηση στην διέγερση από την LH φαίνεται ότι είναι ένα σημαντικό γεγονός στην βιοσύνθεση των ανδρογόνων (27). Καθώς η διέγερση της LH αυξάνει, αρχίζει η απευαισθητοποίηση της απάντησης στην LH (ομόλογη απευαισθητοποίηση). Ο μηχανισμός της απευαισθητοποίησης έχει μελετηθεί με κάθε λεπτομέρεια στα κύτταρα του Leydig. Η υπερευαισθητοποίηση από την LH η οποία προκαλείται με χρόνο- και δόσο-εξαρτόμενο τρόπο αρχικά απευαισθητοποιεί τους υποδοχείς της LH και την δραστικότητα της αποκοπής της πλαγίας αλύσεως της χοληστερόλης (side chain cleavage), και ακολούθως απευαισθητοποιεί τη δραστικότητα της 17,20 λυάσης και της 17-υδροξυλάσης. Στην πορεία αυτής της διαδικασίας το ποσοστό παραγωγής των ανδρογόνων από 17-υδροξυπρογεστερόνη αυξάνει καθώς η LH φθάνει στο άνω όριο της διέγερσης.

Ο συντονισμός της βιοσύνθεσης των ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης και η λειτουργία των κοκκιωδών κυττάρων φαίνεται να εξαρτώνται σημαντικά από τις δραστικότητες της 17-υδροξυλάσης/17,20 λυάσης από ειδικούς αυτοκρινείς, παρακρινείς και ορμονικούς παράγοντες. Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες είναι LH-εξαρτώμενοι ενώ άλλοι είναι FSH-εξαρτώμενοι Οι διαδικασίες που μεσολαβούν στην απευαισθητοποίηση των δραστικοτήτων της 17-υδροξυλάσης/17,20 λυάσης σε απάντηση στην LH εξισορροπούνται από διαδικασίες που επάγουν αυτές τις δραστηριότητες (27). Τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα φαίνεται να είναι αρνητικοί τροποποιητές της παραγωγής ανδρογόνων ως απάντηση στην LH, πιθανώς μέσω σύνδεσης με υποδοχείς αλλά και με ανεξάρτητους μηχανισμούς. Το σύστημα IGF μέσα στο ωάριο

φαίνεται να έχει ένα σημαντικό ρόλο στην θετική ωοθηκική απάντηση στην LH. Σε μοντέλα τρωκτικών, έχει δειχθεί ότι οι IGFs δρουν αυξάνοντας τα επίπεδα του mRNA του ενζύμου κοπής αλύσεως στα κύτταρα της θήκης και επίσης δρουν επιβοηθώντας την ικανότητα της LH να αυξάνει τα επίπεδα του P450c17 mRNA. Η ινσουλίνη παρομοίως υποβοηθά την LH-εξαρτώμενη παραγωγή ανδρογόνων μέσω αρκετών δυναμικών μηχανισμών. Η ινσουλίνη μπορεί να δρα μέσω του υποδοχέα της, του υποδοχέα IGF-I, άτυπους IGF-I υποδοχείς ή μέσω ενός υβριδικού υποδοχέα, ο οποίος περιέχει ένα συνδυασμό α- και β- υποομάδων και των δύο υποδοχέων. Η ινσουλίνη, μειώνοντας τα επίπεδα της δεσμευτικής πρωτεϊνης της IGF-I μπορεί να αυξήσει το κλάσμα της ελεύθερης IGF-I το οποίο είναι βιοδιαθέσιμο (35). Η ανασταλτίνη (inhibin) διεγείρει την ωοθηκική παραγωγή ανδρογόνων, ενώ τα ανδρογόνα με την σειρά τους διεγείρουν την ωοθηκική παραγωγή ινχιμπίνης (36). Η ακτιβίνη (activin) αντιτίθεται στη δράση της ινχιμπίνης (37). Μια ποικιλία από άλλα ωοθηκικά πεπτίδια είναι επίσης ικανά να ρυθμίζουν την σύνθεση ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης (27). Οι διεγέρτες περιλαμβάνουν την προσταγλανδίνη και την αγγειοτενσίνη. Οι αναστολείς περιλαμβάνουν την CRH, τον TGFβ, τον επιδερμικό παράγοντα της αύξησης (epidermal growth factor), τον TNF και τις κυτοκίνες.

Η ανάπτυξη των κοκκιωδών κυττάρων είναι ένας ακόμα σημαντικός αποφασιστικός παράγοντας της ωοθηκικής παραγωγής ανδρογόνων (27). Τα ωοθηλάκια αναπτύσσονται και σε μεγάλους αριθμούς κοκκιωδών κυττάρων και εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα αρωματάσης καθώς ωριμάζουν. Τα υγιή ωοθυλάκια >8mm σε διάμετρο μετατρέπουν ικανοποιητικά ανδροστενεδιόνη σε οιστραδιόλη. Από την άλλη πλευρά ο αριθμός των κοκκιωδών κυττάρων

και η δραστικότητα της αρωματάσης είναι χαμηλά σε άτρητα η κυστικά ωοθηλάκια έτσι ώστε αυτά έχουν υψηλό λόγο ανδροστενεδιόνης προς οιστραδιόλη, είναι δηλαδή ανδρογενή (27).

Ποιοί είναι οι παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν τον πολλαπλασιασμό και την υγεία του πληθυσμού των κοκκιωδών κυττάρων?

Η αύξηση των ωοθυλακίων με άντρο πέραν του σταδίου 2-5mm απαιτεί την δράση της FSH στα κοκκιώδη κύτταρα (37). Οι δράσεις της FSH στα κοκκιώδη κύτταρα διεκπεραιώνονται τουλάχιστον σε ένα μέρος από το σύστημα IGF (38). Σε συνέργεια με την FSH, η IGF-I και η ινσουλίνη (σε φυσιολογικές αλλά γενικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από την IGF-I) διεγείρουν την παραγωγή οιστραδιόλης σε καλλιέργειες κοκκιωδών κυττάρων (39). Απο την άλλη πλευρά, οι IGF δεσμευτικές πρωτεΐνες αναστέλλουν την βιοδραστικότητα της FSH, ενώ ο TGF-α και ο επιδερμικός παράγοντας αύξησης (epidermal growth factor) αναστέλλουν την αρωματάση (39). Αν και η activin αναστέλλει την έκκριση ανδρογόνων από την θήκη, η ίδια προάγει την έκκριση οιστρογόνων από τα κοκκιώδη κύτταρα (40).

13. Επινεφρίδια.

Η επινεφριδιακή έκκριση 17-κετοστεροειδών είναι χαμηλή στην παιδική ηλικία. Αυξάνει βαθμιαία στην μέση παιδική ηλικία ως αποτέλεσμα της αδρεναρχής, της "επινεφριδιακής εφηβείας" κατά την οποία ο άξονας των επινεφριδίων αναπτύσει την ικανότητα να εκκρίνει 17-κετοστεροειδή (41). Κατά την διάρκεια της αδρεναρχής η θειϊκή DHEA γίνεται η κύρια επινεφριδιακή έκκριση όπως είναι και η κορτιζόλη. Η αδρεναρχή αντιπροσωπεύει μια αλλαγή στο μοτίβο

της επινεφριδιακής εκκριτικής απόκρισης στην ACTH, και χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα 17-υδροξυπρεγνενολόνης και DHEA ως απόκριση στην δράση της ACTH, χωρίς να αλλάζει η απόκριση της κορτιζόλης (42). Η αδρεναρχή φαίνεται να σχετίζεται με την ανάπτυξη της δικτυωτής ζώνης του φλοιού των επινεφριδίων (zona reticularis). Αυτή η ζώνη σχηματίζεται στην αδρεναρχή, εκφράζει λίγη 3β δραστικότητα και έχει δράση σουλφοκινάσης η οποία συνδέει την DHEA ώστε να σχηματίσει θειϊκή DHEA (43). Δεδομένα in vitro και in vivo υποδεικνύουν ότι αυτή η ζώνη υφίσταται ωρίμανση των δράσεων της 17-υδροξυλάσης και της 17,20 λυάσης (42). Η ινσουλίνη και η IGF-I διεγείρουν την έκφραση των δράσεων τόσο της επινεφριδιακής 3β όσο και του P450c17 (43).

Αν και η αδρεναρχή δεν σχετίζεται με την αληθή εφηβεία (εξαρτώμενη από τις γοναδοτροπίνες "γοναδική εφηβεία"), η γοναδική λειτουργία μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην υποστήριξη της παραγωγής θειϊκών επινεφριδιακών DHEA (44). Η ωοθηκική ανεπάρκεια και η ωοθηκεκτομή προκαλούν μια γρήγορη πτώση των επιπέδων θειϊκών DHEA, ωστόσο η υποκατάσταση με οιστρογόνα δεν έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην πτώση των θειϊκών DHEA (45). Τα επίπεδα των θειϊκών DHEA στο πλάσμα είναι τα δύο τρίτα των επιπέδων των ανδρών (46).

Αρκετά αντικρουόμενες απόψεις υπάρχουν, σχετικά με την ύπαρξη και την φύση ενός "παράγοντα αδρεναρχής". Αυτός ο παράγοντας έχει θεωρηθεί ότι είναι υποφυσιακός, μια ορμόνη σχετιζόμενη με την ACTH διαφορετική όμως από την ACTH, επειδή η παραγωγή επινεφριδιακών ανδρογόνων είναι περισσότερο ευαίσθητη στην καταστολή από τα γλυκοκορτικοειδή από ότι είναι η παραγωγή κορτιζόλης (47). Οι παράγοντες οι οποίοι κυρίως

θεωρούνται ότι μπορεί να είναι αυτός ο παράγοντας, περιλαμβάνουν ένα παράγωγο της προπιομελανοκορτίνης και την CRH. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η CRH διεγείρει την έκκριση θειϊκών DHEA ιδιαίτερα σε ανθρώπινα πλακουντιακά επινεφριδιακά κύτταρα (48), σε αντίθεση με την αναφερθείσα ανασταλτική δράση στην έκκριση από την θήκη DHEA (49). Η μόνη αποδεδειγμένα επινεφριδιακή ορμόνη η οποία διεγείρει τα ανδρογόνα στην μετα νεογνική ζωή είναι η ACTH. Επειδή το μοτίβο της επινεφριδιακής έκκρισης αντιπροσωπεύει μια αλλαγή από το μοτίβο της στεροειδογενούς απάντησης στην ACTH, ένας παράγοντας αδρεναρχής χρειάζεται απλώς να ελέγχει την άυξηση και την διαφοροποίηση της zona reticularis ή να ρυθμίζει στεροειδογενή ένζυμα, όπως να ελαττώνει την δραστικότητα της 3β ή να αυξάνει την δραστικότητα της 17,20-λυάσης του P450c17. Η φωσφορυλίωση τη σερίνης είναι ένας δυναμικός μηχανισμός με τον οποίον η δραστικότητα της 17,20-λυάσης του P450c17 αυξάνεται εκλεκτικά (50).

14. Περιφερικός μεταβολισμός των εκκρινόμενων προμορίων.

Τα 17-κετοστεροειδή είναι προανδρογόνα. Τόσο η περιφερική μετατροπή σε τεστοστερόνη των 17β-υδροξυστεροειδών αλλά και η διυδροτεστοστερόνη απαιτείται για την ανδρογενή δράση. Περίπου η μισή τεστοστερόνη του πλάσματος παράγεται από την περιφερική μετατροπή της ανδροστενεδιόνης. Η υπόλοιπη παράγεται από άμεση ωοθηκική και επινεφριδιακή έκκριση. Οι κύριες ανατομικές λέξεις της περιφερικής μετατροπής είναι ο πνεύμονας, το ήπαρ, ο λιπώδης ιστός και το δέρμα (51). Οι παράγοντες οι οποίοι ελέγχουν αυτές τις μετατροπές δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί. Κάτω από

συνθήκες υπερδιέγερσης με γοναδοτροπίνες, η θειϊκή DHEA του πλάσματος γίνεται το κύριο υπόστρωμα για την βιοσύνθεση της ωοθηκικής τεστοστερόνης (52).

Η διυδροτεστοστερόνη του πλάσματος αυξάνει κυρίως λόγω της δραστικότητας της 5α-ρεδουκτάσης στην περιφέρεια. Η ανδροστενεδιόνη πλάσματος είναι το κύριο προμόριο της διυδροτεστοστερόνης στις γυναίκες, αποτελώντας περισσότερο από το 60% των κυκλοφορούντων επιπέδων (53). Ο λιπώδης ιστός σχηματίζει διυδροτεστοστερόνη κυρίως από οιστρόνη και ανδροστενεδιόνη. Η παχυσαρκία επομένως, προκαλεί μια κατάσταση περίσσειας οιστρογόνων (54).

Β. Παθογένεια.

1. Η Ωοθηκική λειτουργία στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

Η παρουσία διογκωμένων πολυκυστικών ωοθηκών έχει δείξει ότι οι ωοθήκες είναι η πρωτοπαθής εστία της διαταραχής στο PCOS. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι ωοθήκες συνήθως παράγουν υψηλές ποσότητες ανδρογόνων. Η καταστολή της ωοθηκικής λειτουργίας από οιστρογόνα-προγεστερόνη (αντισυλληπτικά) (54) ή μακράς διάρκειας χορήγηση αγωνιστών της GnRH τυπικά καταστέλλει τα αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων (55). Επιπροσθέτως η καταστολή της επινεφριδιακής λειτουργίας από την χορήγηση δεξαμεθαζόνης σπάνια διορθώνει τα επίπεδα ελεύθερης τεστοστερόνης πλάσματος, ωστόσο συχνά τα βελτιώνει (56). Αυτά τα ευρήματα έχουν δείξει ότι το PCOS είναι μια μορφή λειτουργικής ωοθηκικής υπερανδρογοναιμίας (57).

2. Δυσλειτουργία κυττάρων θήκης.

Η χρησιμοποίηση μίας ειδικής δοκιμασίας ελέγχου της συνδυασμένης λειτουργίας των τμημάτων των ωοθηλακίων της ωοθήκης ταυτοποίησε ένα ειδικό τύπο ωοθηκικής δυσλειτουργίας στην μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών με κλασσικό PCOS. Όταν σε φυσιολογικές γυναίκες δίνεται μια μόνη δόση από ένα ισχυρό GnRH αγωνιστή, όπως η nafarelin ή leuprolide, συμβαίνει μια πρόωρη αιχμή της LH και της FSH η οποία είναι προωρηξιακού μεγέθους (27). Ως απάντηση σε αυτό η οιστραδιόλη και η οιστρόνη του πλάσματος αυξάνει στο τριπλάσιο μέσα σε 24 ώρες. Η διαδικασία αυτή είναι αρκετά ικανοποιητική επειδή υπάρχει σχετικά μικρή αύξηση στα επίπεδα των προμορίων της οιστραδιόλης.

Οι ασθενείς με κλασσική PCOS (υπερανδρογοναιμία με διαταραχή της LH η υπερηχογραφική τεκμηρίωση ή και τα δύο) απαντούν χαρακτηριστικά σε ένα τέστ πρόκλησης με GnRH αγωνιστή με υπεραπόκριση της 17-υδροξυπρογεστερόνη του πλάσματος και σε μικρότερο βαθμό της ανδροστενεδιόνης (27). Το μοτίβο των στεροειδικών απαντήσεων δεν είναι συμβατό με κανένα γνωστό ενζυμικό αποκλεισμό. Τα ενδιάμεσα μόρια από την 17-υδροξυπρογεστερόνη και την ανδροστενεδιόνη και πιο πάνω υπεραποκρίνουν. Η τεστοστερόνη αυξάνει ελαφρά αλλά σημαντικά ενώ η οιστρόνη και οιστραδιόλη στο μέγιστο βαθμό. Το 3β-υδροξυ μεσολαβεί μόνο μερικώς στην αύξηση της πρεγνενολόνης, της 17-υδροξυπρογεστερόνης και των DHEA. Αυτό το πλαίσιο στεροειδικής έκκρισης δείχνει ότι υπάρχει γενικευμένη δυσλειτουργία της ωοθηκικής έκκρισης ανδρογόνων, η οποία είναι ιδιαίτερα εμφανής στο επίπεδο δραστικότητας της 17-υδροξυλάσης και

της 17,20-λυάσης. Η βιοχημική δράση αυτής της δυσλειτουργίας είναι ασαφής. Πρόσφατες δημοσιεύσεις δείχνουν ότι το P450c17 είναι η κύρια πηγή της δραστικότητας της 17,20-λυάσης (58). Εάν αυτό είναι αληθές, η 17-υδροξυπρογεστερόνη είναι ένας απλός δείκτης της δυσλειτουργίας του P450c17 η οποία συσσωρεύεται οδηγώντας σε ένα «μεταβολικό αδιέξοδο», ενώ η ανδροστενεδιόνη σχηματίζεται κυρίως από 17-υδροξυπρογεστερόνη μέσω DHEA.

Ένας τύπος ωοθηκικής δυσλειτουργίας που μοιάζει με PCOS βρίσκεται σε περισσότερους από τις μισές υπερανδρογοναιμικές ασθενείς, ακόμα και στις περισσότερες που τους λείπουν τα κλασσικά κριτήρια για την διάγνωση του συνδρόμου PCOS. Ο Rosenfield και οι συνεργάτες του το 1992 μελέτησαν 40 υπερανδρογοναιμικές γυναίκες οι οποίες εμφανίσθηκαν στα τμήματα της αναπαραγωγικής ενδοκρινολογίας, ιατρικής ενδοκρινολογίας ή παιδιατρικής ενδοκρινολογίας με ολιγομηνόρροια, υπερτρίχωση ή ακμή και που συμφώνησαν να υποστούν έλεγχο ACTH με GnRH αγωνιστή, δεξαμεθαζόνη (59). Η υπερπρολακτιναιμία και το σύνδρομο Cushing αποκλείστηκαν. Μια απόκριση στον GnRH αγωνιστή με αύξηση της 17-υδροξυπρογεστερόνης βρέθηκε σε 23 από τις 40 γυναίκες (58%). Είκοσι δύο από αυτές τις 23 γυναίκες (96%) είχαν διαταραγμένο τέστ καταστολής ανδρογόνων με δεξαμεθαζόνη. Το τεστ δεξαμεθαζόνης ήταν παθολογικό σε 27 γυναίκες, από τις οποίες 22 (81%) είχαν μη φυσιολογική απάντηση στο τεστ με το GnRH αγωνιστή. Λειτουργική ωοθηκική υπερανδρογοναιμία βρίσκεται στο 70% των υπερανδρογοναιμικών γυναικών όταν είτε το τεστ με τον GnRh αγωνιστή είτε το τεστ καταστολής δεξαμεθαζόνης χρησιμοποιείται ως διαγνωστικό κριτήριο.

Δεδομένα in vitro και in vivo δείχνουν ότι τα κύτταρα της θήκης από τους

ασθενείς με PCOS έχουν γενικευμένη υπεραπόκριση της στεροειδογένεσης από την θήκη. Κατά την διάρκεια του ελέγχου GnRH, οι ασθενείς εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα ή αποκρίσεις όλων των πρόδρομων μορίων της οιστραδιόλης τα οποία μελετήθηκαν πέρα από την πρεγνενολόνη, αν και για κάθε ένα από αυτά οι αυξήσεις δεν συνέπιπταν (π.χ. DHEA) ή ήταν οριακά σημαντικές (π.χ. προγεστερόνη) ή μετρίως (π.χ. 17-υδροξυπρεγνενολόνη).

Σε πρωτογενείς καλλιέργειες από κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων γυναικών με PCOS, που απομονώθηκαν πρόσφατα, βρέθηκε ότι τα κύτταρα αυτά παράγουν περισσότερη δεϋδροεπιανδροστερόνη, 17-υδροξυπρογεστερόνη και ανδροστενδιόνη από ό,τι τα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων, που απομονώθηκαν από γυναίκες χωρίς το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (60). Με τη βοήθεια μιας μεθόδου διατήρησης ανθρώπινων κυττάρων της έσω θήκης σε μακροχρόνια καλλιέργεια, ο Nelson και οι συνεργάτες του το 1999 (61) έδειξαν ότι η αυξημένη παραγωγή των στεροειδών αυτών αποτελεί μόνιμο βιοχημικό φαινόμενο των κυττάρων της έσω θήκης ωοθυλακίων γυναικών με PCOS. Δεδομένου ότι οι παραπάνω καλλιέργειες των κυττάρων της έσω θήκης, μπορούν να διατηρηθούν μέσω επαναλαμβανόμενων πολλαπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού, η αυξημένη στεροειδογόνος δραστηριότητα των κυττάρων της θήκης από γυναίκες με PCOS, σε σύγκριση με τα κύτταρα της θήκης εκείνων χωρίς το σύνδρομο, είναι απίθανο να αντανακλά την επίδραση της ορμονικής διέγερσης *in vivo*, όπως, για παράδειγμα, της αυξημένης LH ή των αυξημένων επιπέδων ινσουλίνης που παρατηρούνται στο PCOS. Κατά συνέπεια, οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι οι διαταραχές στη βιοσύνθεση των

ανδρογόνων αποτελούν ενδογενή ιδιότητα των κυττάρων της έσω θήκης ωοθυλακίων γυναικών με PCOS (62).

3. Δυσλειτουργία των κοκκιωδών κυττάρων.

Μολονότι η διαταραχή της στεροειδογένεσης των κυττάρων της έσω θήκης φαίνεται ότι αποτελεί τον κύριο υπεύθυνο για την ενδοωοθηκική υπερανδρογοναιμία στο PCOS, διαταραχές των κυττάρων της κοκκιώδους στοιβάδας θα μπορούσαν ενδεχομένως να παίξουν κάποιο ρόλο, μέσω των εκκρίσεων των κυττάρων αυτών.

Τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας των ωοθυλακίων παράγουν ινχιμπίνες, οι οποίες πιστεύεται ότι τροποποιούν άμεσα την ωοθυλακική στεροειδογένεση. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι η ινχιμπίνη Α ενισχύει τόσο τη βασική όσο και την προκαλούμενη από την LH παραγωγή ανδρογόνων σε καλλιέργειες ανθρωπίνων κυττάρων της έσω θήκης ωοθυλακίων (79). Έτσι, οι ινχιμπίνες θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην περίσσεια ωοθηκικών ανδρογόνων στο PCOS, μέσω παρακρινικής επίδρασης από τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας (80-82).

Η χρήση ανοσολογικών μεθόδων, που ανιχνεύουν διμερείς ινχιμπίνες στον ορό, έδωσε τη δυνατότητα της αποκάλυψης μιας ιδιαίτερης δυσλειτουργίας του συστήματος των ινχιμπινών στο PCOS. Η δυσλειτουργία αυτή περιλαμβάνει την καθαρή αύξηση των επιπέδων των πρόδρομων πρωτεϊνών της α-ινχιμπίνης (pro-a C) στον ορό, που παρουσίαζε θετική συσχέτιση, στατιστικά σημαντική, με τα επίπεδα των ανδρογόνων (83). Πρέπει, πάντως, να σημειωθεί ότι τα βιβλιογραφικά δεδομένα, όσον αφορά τη συμβολή των

ινχιμπινών στην υπερανδρογοναιμία του PCOS, είναι ανεπαρκή και αντικρουόμενα και, επομένως, δεν είναι δυνατή η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων (84,85).

Η AMH (Anti-Müllerian Hormone), η οποία παράγεται από τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας, θα μπορούσε να υπεισέρχεται στην υπερανδρογοναιμία του PCOS. Έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα AMH στο PCOS (86,87). Επιλέον, βρέθηκε θετική συσχέτιση, στατιστικά σημαντική, μεταξύ των επιπέδων της AMH και των τιμών της τεστοστερόνης και της ανδροστενδιόνης ορού στις ασθενείς με PCOS, όχι, όμως, στις μάρτυρες (88). Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να υποδηλώνει θετική παρακρινική επίδραση της AMH στα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων γυναικών με PCOS. Η ανεύρεση υποδοχέων AMH τύπου II (AMHRII) στα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων στο στάδιο της ωρίμανσης (89) θα μπορούσε να στηρίζει την ύπαρξη της παρακρινικής επίδρασης της AMH στα κύτταρα της έσω θήκης, όπως αναφέρεται για τα κύτταρα Leydig. Εντούτοις, απαιτούνται και άλλες πειραματικές μελέτες πριν να υποστηριχθεί η θέση για τις επιπτώσεις της AMH στη δυσλειτουργία των κυττάρων της έσω θήκης των ωοθυλακίων γυναικών με PCOS. Πρέπει, για παράδειγμα, να ερευνηθεί αν η ωοθηκική επίδραση της AMH είναι αντίθετη από εκείνη που ασκεί στον όρχι. Έτσι, έχει βρεθεί ότι σε καλλιέργειες κυττάρων Leydig ποντικού η AMH προκαλούσε αναστολή της έκφρασης του CYP17, που προκαλείται από την LH και το κυκλικό AMP (90).

4. Παράγοντες από το ωοκύτταρο.

Έχει προταθεί η άποψη ότι το ωοκύτταρο μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας των κυττάρων της έσω θήκης, αλλά τα διαθέσιμα στοιχεία είναι ακόμη αντιφατικά. Ο αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης-9 (GDF-9) διεγείρει τη βασική και την προκαλούμενη από την LH βιοσύνθεση ανδρογόνων από τα κύτταρα της έσω θήκης ωοθυλακίων αρουραίων (91). Αντίθετα, η προσθήκη GDF-9 *in vitro* σε ανθρώπινα κύτταρα της έσω θήκης αύξησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά παρεμπόδισε τη σύνθεση προγεστερόνης και ανδρογόνων (92). Έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης του GDF-9 είναι μειωμένα στις πολυκυστικές ωοθήκες (93). Θα μπορούσε, λοιπόν, να υποτεθεί ότι τα χαμηλά επίπεδα GDF-9 αποτελούν μία από τις αιτίες της αυξημένης σύνθεσης ανδρογόνων στα ωοθυλάκια γυναικών με PCOS. Τα στοιχεία, όμως, είναι ανεπαρκή για να τεκμηριώσουν κάποιο ρόλο στο ωοκύτταρο, σχετικά με την παθοφυσιολογία της υπερανδρογοναιμίας στο PCOS.

5. Εξωοθηκικοί παράγοντες.

α. Ινσουλίνη.

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που ενισχύουν την άποψη ότι η ινσουλίνη υπεισέρχεται στη μοριακή παθογένεια της υπερανδρογοναιμίας από τα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων γυναικών με PCOS. Είναι γνωστό ότι υψηλό ποσοστό ασθενών με PCOS παρουσιάζει αντίσταση στην ινσουλίνη

και αντισταθμιστική υπερινσουλιναιμία (94). Εντούτοις, η επίδραση της ινσουλίνης στην υπερπαραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων μπορεί να παρατηρηθεί και όταν δεν υπάρχει κλινικά εμφανής υπερινσουλιναιμία (95). Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η χορήγηση διαζοξίδης σε γυναίκες με PCOS και κλινικά φυσιολογική ευαισθησία στην ινσουλίνη μείωσε τα επίπεδα της ελεύθερης τεστοστερόνης, ενώ η καταστολή της LH με GnRH-ανάλογα δεν προκάλεσε παρόμοια μεταβολή (96). Φαίνεται ότι η ινσουλίνη διεγείρει τη δραστικότητα του ενζύμου κυττόχρωμα P450c17α, μέσω των υποδοχέων της στα κύτταρα της έσω θήκης. Η επίδραση αυτή την ινσουλίνης ασκείται είτε με διέγερση της δραστικότητας της 17α-υδροξυλάσης ή με διέγερση της έκφρασης του mRNA του CYP17 (97).

β. Προφλεγμονώδεις κυττοκίνες.

Μολονότι έχει αναγνωρισθεί η ύπαρξη ήπιας χρόνιας φλεγμονής στο PCOS, τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα δεν στηρίζουν τη θέση της εμπλοκής της στην υπερπαραγωγή ανδρογόνων. Εντούτοις, έχει αναφερθεί ότι το stress της φλεγμονής αυξάνει την πολλαπλασιαστική δράση της ινσουλίνης στα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου (98.99). Επιπλέον, η αύξηση της έκφρασης του PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) συνδυάζεται με υψηλά επίπεδα ανδρογόνων, εύρημα συμβατό με την άποψη ότι ο PAI-1 αποτελεί έναν από τους ρυθμιστές της ωοθηκικής υπερανδρογοναιμίας στο PCOS. Τα αυξημένα επίπεδα του PAI-1 στις γυναίκες με PCOS υποδηλώνουν ήπια χρόνια φλεγμονή και ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα των ορμονικών,

μεταβολικών και γενετικών διαταραχών του συνδρόμου (100). Η αυξημένη έκφραση του PAI-1 μέσα στα κύτταρα της θήκης και της κοκκιώδους στιβάδας του ωοθυλακίου σε δείγματα ωοθηκών από γυναίκες με PCOS καθιστούν ισχυρή την άποψη ότι ο παράγοντας αυτός μπορεί να υπεισέρχεται στη λειτουργία των κυττάρων της έσω θήκης και της κοκκιώδους στιβάδας στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

γ. Διαταραχές του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση.

Είναι γνωστό ότι η GnRH εκκρίνεται κατά εκκριτικά επεισόδια. Τα εκκριτικά επεισόδια της GnRH στην πρώιμη παραγωγική φάση του κύκλου ωοθυλακιορρηκτικών γυναικών είναι 10-12 στο εικοσιτετράωρο (ένα εκκριτικό επεισόδιο κάθε δύο ώρες). Στις γυναίκες με PCOS τα εκκριτικά επεισόδια της GnRH είναι 24, περίπου, το εικοσιτετράωρο (ένα εκκριτικό επεισόδιο κάθε μία ώρα). Έχει υποστηριχθεί η άποψη ότι η αύξηση της συχνότητας των εκκριτικών επεισοδίων της GnRH οφείλεται σε αρρενοποίηση του υποθαλάμου, που γίνεται κατά την ενδομήτρια ζωή. Η έκθεση του υποθαλάμου σε υψηλά επίπεδα οιστρογόνων, για μεγάλο χρονικό διάστημα, κατά την ενδομήτρια ζωή οδηγεί σε αρρενοποιητική ρύθμιση του υποθαλάμου, ενώ η έκθεση σε χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων κατά την ενδομήτρια ζωή προκαλεί θηλεοποιητική ρύθμισή του (101). Οι όρχεις του άρρενα εμβρύου κατά τον τρίτο μήνα της ενδομήτριας ζωής παράγουν τεστοστερόνη σε επίπεδα παρόμοια με εκείνα του ενήλικα. Η τεστοστερόνη αυτή μετατρέπεται, με την βοήθεια της αρωματάσης, στον υποθάλαμο, σε οιστραδιόλη, με αποτέλεσμα την αρρενοποίηση του υποθαλάμου. Στο θήλυ

έμβρυο, εφόσον υπάρχει κάποια ενδογενής παραγωγή ανδρογόνων (συγγενής υπερπλασία επινεφριδίων της μητέρας) ή η ενζυμική υποδομή του υποθαλάμου (αρωματάση) ή του λιπώδη ιστού (μακροσωμικά έμβρυα) είναι έντονη, ο υποθάλαμος αρρενοποιείται. Οι περισσότεροι, όμως, ερευνητές δέχονται ότι ο γοναδοστάτης (το κέντρο του υποθαλάμου που ρυθμίζει τα εκκριτικά επεισόδια της GnRH) των γυναικών με PCOS εμφανίζει μειωμένη ευαισθησία στην ανασταλτική δράση της συνδυασμένης επίδρασης οιστρογόνων και προγεστερόνης. Στις ωοθυλακιορρηκτικές γυναίκες, η συνδυασμένη δράση οιστρογόνων και προγεστερόνης, ύστερα από την ωοθυλακιορρηξία, οδηγεί σε αραίωση των εκκριτικών επεισοδίων της GnRH. Στο PCOS είτε δεν γίνεται ωοθυλακιορρηξία, τα επίπεδα δηλαδή της προγεστερόνης είναι πολύ χαμηλά, ή και όταν γίνεται ωοθυλακιορρηξία ο ουδός του γοναδοστάτη στην ανασταλτική δράση της προγεστερόνης είναι αυξημένος (102-104).

Έχει αναφερθεί ότι τα συχνά εκκριτικά επεισόδια της GnRH διεγείρουν την έκφραση του γονιδίου της β- υπομονάδας της LH, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της LH. Αντίθετα, τα αραιά εκκριτικά επεισόδια της GnRH, που παρατηρούνται στην όψιμη εκκριτική φάση των ωοθυλακιορρηκτικών γυναικών, διεγείρουν την έκφραση του γονιδίου της β-υπομονάδας της FSH, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της FSH και την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Η αύξηση των επιπέδων της LH έχει ως αποτέλεσμα της υπερπαραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων (105-106).

Έχει βρεθεί ότι ένας άλλος παράγοντας ωοθηκικής προέλευσης, ο παράγοντας που εξασθενεί το κύμα των γοναδοτροπινών (Gonadotrophin

Surge-Attenuating Factor: GnSAF), ρυθμίζει και καταστέλλει την έκκριση της LH, μειώνοντας την ευαισθησία της υπόφυσης. Τα επιπέδα του παράγοντα αυτού είναι χαμηλά στις ασθενείς με PCOS (107). Τα χαμηλά επίπεδα του GnSAF εμπλέκονται ενδεχομένως στην ανεύρεση υψηλών τιμών LH, προάγοντας, έτσι, την υπερανδρογοναιμία στις γυναίκες με PCOS.

6. Παθογένεια της ωοθηκικής δυσλειτουργίας.

Πρωτοπαθής υπερέκκριση LH έχει από καιρό θεωρηθεί ως η κύρια αιτία της υπερβολικής έκκρισης ωοθηκικών ανδρογόνων σε ασθενείς με PCOS. Αυτό προκύπτει από το γνωστό διεγερτικό αποτέλεσμα της LH στην ωοθηκική λειτουργία και την αύξηση των επιπέδων LH σε απάντηση στην GnRH στο κλασσικό PCOS. Ωστόσο ένας πρωταγωνιστικός ρόλος της περίσσειας LH είναι αμφισβητήσιμος. Τα κύτταρα θήκης των πολυκυστικών ωοθηκών εκκρίνουν ανώμαλα ποσά στεροειδών στην καλλιέργεια και πριν και μετά την διέγερση με LH (60).

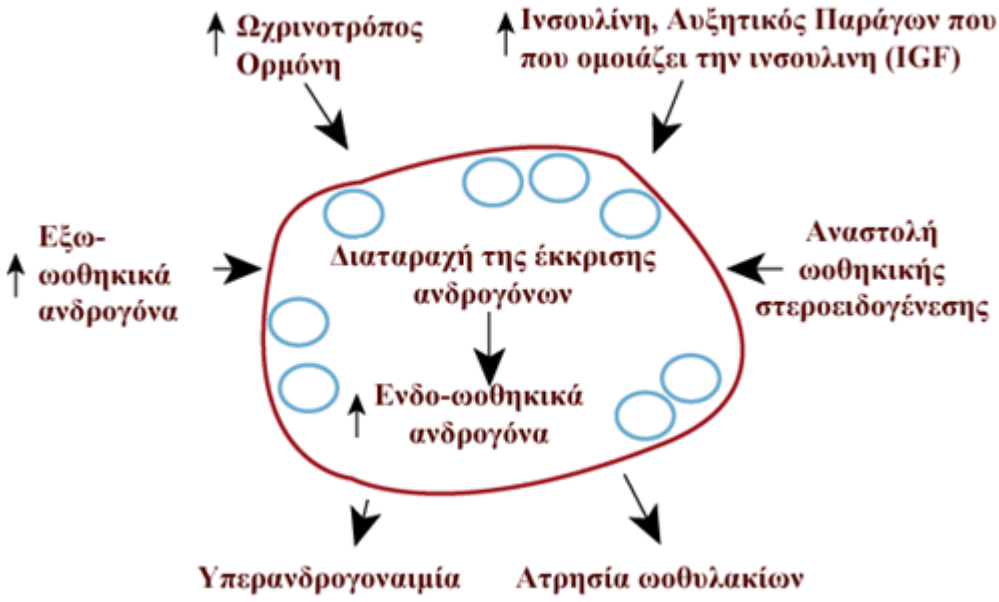
Επιπλέον όταν σε ασθενείς με PCOS χορηγείται μια συγκεκριμένη δόση της hCG (ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης) ή ενός LH ανάλογου, αυτές έχουν υπεραπαντήσεις σε 17-υδροξυπρογεστερόνη και ανδροστενεδιόνη (109). Επιπροσθέτως, οι ασθενείς με PCOS συνεχίζουν να εκδηλώνουν υπεραπόκριση της 17-υδροξυπρογεστερόνης στην hCG παρά την διόρθωση της βασικής τιμής της LH μετά από ένα μήνα θεραπεία με GnRH αγωνιστή (60). Παρά ταύτα αυτά τα δεδομένα δεν είναι επαρκή να λύσουν το ερώτημα του εάν η ανωμαλία σχετίζεται απλά με υπολειπόμενη θηκική κυτταρική υπερπλασία από μη ικανοποιητική LH διέγερση (110). Επιπλέον στοιχεία τα

οποία συνηγορούν κατά του πρωτοπαθούς ρόλου της περίσσειας LH, είναι ότι ο PCOS τύπος της ωοθηκικής δυσλειτουργίας συμβαίνει με ή χωρίς τα κλασσικά PCOS χαρακτηριστικά της περίσσειας LH (27). Ωστόσο μπορεί να αντιπαρατεθεί ότι αυτοί οι ασθενείς μπορεί να εκκρίνουν ένα LH μόριο με αυξημένη βιοδραστικότητα (111) ή όπως πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι τα επίπεδα γοναδοτροπινών του ορού σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με την ύπαρξη λιπώδους ιστού σε ασθενείς με PCOS (112) και ότι η υπερινσουλιναιμία της παχυσαρκίας ενισχύει το αποτέλεσμα των φυσιολογικών επιπέδων γοναδοτροπινών.

Τα αποτελέσματα από κλινικές έρευνες δείχνουν ότι οι ασθενείς με λειτουργική ωοθηκική υπερανδρογοναιμία, ανεξαρτήτως του εάν έχουν κλασσική ή μη κλασσική PCOS, έχουν καμπύλη δόσης απάντησης LH-17-υδροξυπρογεστερόνης μετατοπισμένη προς τα πάνω και αριστερά (60). Καλλιεργημένα κύτταρα θήκης από πολυκυστικές ωοθήκες φαίνονται επίσης ότι έχουν καμπύλες LH-στεροειδών δόσης- απάντησης που μετατοπίζονται προς τα πάνω και αριστερά (60). Επειδή και οι δύο σειρές των στοιχείων δείχνουν ότι οι στεροειδικές αποκρίσεις δεν εντάσσονται στην φυσιολογική καμπύλη δόσης-απόκρισης LH-στεροειδών, το πρόβλημα στην στεροειδογένεση φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της απόδρασης από την φυσιολογική καταστολή της θηκικής κυτταρικής έκκρισης παρά απο την υπερδιέγερση από την LH.

Ο Rosenfield και συν. το 1993 (108) υποστηρίζει ότι το βασικό πρόβλημα που υπάρχει στην υπερανδρογοναιμία του PCOS με λειτουργική ωοθηκική υπερανδρογοναιμία είναι η ωοθηκική υπεραπόκριση στην δράση των γοναδοτροπινών επειδή αποδρούν από την καταστολή. Η ωοθηκική

δυσλειτουργία φαίνεται να είναι ανεξάρτητη της LH υπεραπόκρισης. Η LH υπεραπόκριση μπορεί να κάνει εντονότερη την ενδογενή ωοθηκική υπερανδρογοναιμική δυσλειτουργία.



7. Επινεφριδιακή υπερανδρογοναιμία.

Η υποτιθέμενη διαταραχή της ρύθμισης της δραστηριότητας του ενζύμου κυττόχρωμα P450c17α, που κωδικοποιείται από το CYPI7, ευθύνεται για την υπερανδρογοναιμία όχι μόνο από τις ωοθήκες αλλά και από τα επινεφρίδια. Υπάρχουν ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι η επινεφριδική υπερανδρογοναιμία αποτελεί γενετικά καθορισμένη διαταραχή στην έκφραση του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών.

Η λειτουργική επινεφριδιακή υπερανδρογοναιμία, η κατασταλμένη απο γλυκοκορτικοειδή ACTH-εξαρτόμενη υπερπαραγωγή 17-κετοστεροειδών βρίσκεται στο ήμισυ των υπερανδρογοναιμικών γυναικών και των ασθενών με

λειτουργική ωοθηκική υπερανδρογοναιμία (27). Οι περισσότερες περιπτώσεις λειτουργικής ωοθηκικής υπερανδρογοναιμίας είναι ιδιοπαθείς (πρωτοπαθείς). Λιγότερο από 10% της επινεφριδιακής υπερανδρογοναιμίας μπορεί μπορεί αναντίρρητα να αποδοθεί σε μια καλά τεκμηριωμένη παθοφυσιολογική οντότητα όπως η μη κλασσική υπερπλασία των επινεφριδίων (27). Η αιτία της πρωτοπαθούς λειτουργικής υπερανδρογοναιμίας έχει προκαλέσει αρκετά σοβαρή αντιπαράθεση.

Η υπερβολικά πρόωρη έναρξη της ήβης προτάθηκε αρχικά ως βάση για την πάνω από το φυσιολογικό φλοιοεπινεφριδιακή δυνατότητα στην σύνθεση των επινεφριδιακών ανδρογόνων από τον Yen και τους συνεργάτες του (113).

Ο Rosenfield και συν. το 1992 ακολούθως καθόρισαν την λειτουργική επινεφριδιακή υπερανδρογοναιμία ως υπεραπόκριση στην ACTH είτε των DHEA είτε της ανδροστενεδιόνης από την κατασταλμένη απο την δεξαμεθαζόνη βασική κατάσταση. Σε μια μελέτη η οποία αφορούσε 40 υπερανδρογοναιμικές γυναίκες οι οποίες συμφώνησαν να υποστούν έλεγχο με ACTH, δεξαμεθαζόνη και GnRH αγωνιστή (114). Το 60% της ομάδας είχε λειτουργική επινεφριδιακή υπερανδρογοναιμία και το 70% λειτουργική ωοθηκική υπερανδρογοναιμία όπως έδειξε το τεστ καταστολής των ανδρογόνων με GnRH αγωνιστή ή με δεξαμεθαζόνη. Οι επινεφριδιακές και ωοθηκικές διαταραχές συνέβησαν μόνες ή σε συνδυασμό. Περίπου 35% των υπερανδρογοναιμικών γυναικών είχαν μόνο λειτουργική ωοθηκική υπερανδρογοναιμία, 35% είχαν λειτουργική ωοθηκική υπερανδρογοναιμία μαζί με λειτουργική επινεφριδιακή υπερανδρογοναιμία, 25% είχαν μόνο λειτουργική επινεφριδιακή υπερανδρογοναιμία και λιγότερο απο 10% των περιπτώσεων ήταν ιδιοπαθείς. Μία από τις 23 γυναίκες (2,5%) είχε ξεκάθαρη

ανεπάρκεια 21-υδροξυλάσης και καμιά δεν είχε τύπο λειτουργικής επινεφριδιακής υπερανδρογοναιμίας ανθεκτικό στην δεξαμεθαζόνη.

Η υπερδραστικότητα της δευδροεπιναδροστερόνης στην ACTH ήταν η συνηθέστερη διαταραχή στην λειτουργική επινεφριδιακή υπερανδρογοναιμία. Αυτή η ομάδα των ασθενών περιλάμβανε 18 απο τις 22 17-κετοστεροειδείς υπεραποκρίσεις. Μόνο 20% της ομάδας αυτής είχαν αυξημένα επίπεδα θειϊκής DHEA. Οι αποκρίσεις της κορτιζόλης ήταν σημαντικά αυξημένες σε αυτή την ομάδα. Οι δείκτες δραστικότητας της 17,20 λυάσης, οι λόγοι των DHEA ή της ανδροστενεδιόνης πρός την κορτιζόλη, ήταν σημαντικά αυξημένοι. Ο Gonzales και οι συνεργάτες του το 1996 (115) βρήκαν στοιχεία συμβατά με υπερδραστικότητα της 17,20 λυάσης σε ασθενείς με χρόνια υπερανδρογοναιμική ανωοθηλακιορρηξία και έδειξαν ότι αυτή επέμενε και μετά την καταστολή των γονάδων. Αυτά τα δεδομένα είναι συμβατά με την πρόταση ότι η δυσλειτουργία στην δραστικότητα του P450c17 είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες περιπτώσεις λειτουργικής επινεφριδιακής υπερανδρογοναιμίας.

Μερικά στοιχεία υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η πρωτοπαθής λειτουργική επινεφριδιακή υπερανδρογοναιμία προκαλείται από δυσλειτουργία της επινεφριδιακής στεροειδογένεσης παρά απο υπεβολική αδρεναρχή. Πρώτον η υπερδραστικότητα της 17-υδροξυλάσης/17,20 λυάσης στο φλοιό των επινεφριδίων φαίνεται ότι συχνά σχετίζεται με υπερδραστικότητα σε αυτά τα μονοπάτια της ωοθήκης. Δεύτερον η επινεφριδιακή υπερπαραγωγή των 17-κετοστεροειδών σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα του δείκτη αδρεναρχής θειϊκής DHEA σε μια μικρή μειονότητα των περιπτώσεων (περίπου 20%). Τρίτον, υπάρχουν στοιχεία διάχυτης αλλά ποικίλης δυσλειτουργίας από έναν

αριθμό θεμάτων η οποία αφορά την έκκριση κορτικοστεροειδών και οδηγεί σε μια τάση για υπερκορτιζολαιμία. Επιπροσθέτως συσσωρεύονται νέα στοιχεία ότι η υπερινσουλιναιμία σχετίζεται και με επινεφριδιακή και με ωοθηκική δυσλειτουργία και ότι υπάρχουν περιφερειακές διαταραχές στο μεταβολισμό των κορτικοστεροειδών.

Η αλλαγή του μεταβολισμού της κορτιζόλης έχει προταθεί ως ένας άλλος υποκείμενος μηχανισμός της λειτουργικής επινεφριδικής υπερανδρογοναιμίας στο PCOS. Ο αυξημένος περιφερικός μεταβολισμός της κορτιζόλης, μπορεί να οφείλεται είτε στην αυξημένη αδρανοποίηση της κορτιζόλης από την 5α-αναγωγάση ή στην παρεμπόδιση της επανεργοποίησης της κορτιζόλης από την 11β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση 1, οδηγεί σε μείωση της καταστολής της έκκρισης της ACTH. Σημειώνεται ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί εν μέρει να ευθύνεται για την αύξηση της δραστικότητας της 5α- αναγωγάσης της κορτιζόλης, χωρίς να επηρεάζει το ρυθμό παραγωγής της κορτιζόλης. Έτσι, ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια ενδέχεται να διεγείρεται και ο ρυθμός παραγωγής τόσο της κορτιζόλης όσο και των επινεφριδικών ανδρογόνων μπορεί να είναι αυξημένος. Μολονότι τα επίπεδα της κορτιζόλης διατηρούνται στα φυσιολογικά όρια, λόγω αυξημένου μεταβολισμού της κορτιζόλης, οι τιμές των επινεφριδιακών ανδρογόνων αυξάνονται.

Πρέπει, να σημειωθεί ότι οι εκτροπές της επινεφριαδικής λειτουργίας θεωρούνται ότι έχουν περιορισμένη κλινική σημασία στην εκδήλωση της υπερανδρογοναιμίας στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

8. Ο ρόλος του διαταραγμένου περιφερικού μεταβολισμού.

Ο περιφερειακός στεροειδικός μεταβολισμός είναι αλλαγμένος στο PCOS. Ο Rodin και οι συνεργάτες του (116) ανέφεραν στοιχεία τα οποία υποστηρίζουν την δυσλειτουργία της 11β-υδροξυστεροειδούς δευδρογενάσης στην PCOS. Βρήκαν σημαντικώς αυξημένες εκκρίσεις ούρων στους μεταβολίτες της κορτιζόλης και οι λόγοι 11-κέτο προς 11-υδρόξυ μεταβολίτες των κορτικοστεροειδών εμφανίζονται αυξημένοι πάνω από τα φυσιολογικά, σε 40% των ασθενών. Τα δεδομένα είναι συμβατά με ένα αυξημένο μεταβολισμό της κορτιζόλης προκαλώντας μια επαναρύθμιση στην έκκριση της ACTH, με συνεπαγόμενη γενική επινεφριδιακή υπεραπόκριση. Η υπερινσουλιναιμία έχει προταθεί ως αίτιο αυξημένης κάθαρσης της κορτιζόλης. Στοιχεία οριακής αύξησης της δραστικότητας της 5α-ρεδουκτασης, πιθανώς λόγω της υπερανδρογοναιμίας, έχουν επίσης αναφερθεί (116). Η παχυσαρκία μπορεί να συνεισφέρει στην υπερανδρογοναιμία στο PCOS. Ο λιπώδης ιστός έχει την δυνατότητα να σχηματίσει τεστοστερόνη και οιστρόνη από αδρανείς πρόδρομες ουσίες. Η απώλεια βάρους κατεβάζει στο φυσιολογικό τα επίπεδα των ανδρογόνων σε μερικές περιπτώσεις χρόνιας υπερανδρογοναιμικής ανωοθηλακιορηξίας (117). Εν μέρει αυτό φαίνεται ότι σχετίζεται με την βελτίωση της ωοθηκικής λειτουργίας η οποία συμβαίνει από τα χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης (118).

Γ. Γενετική του Συνδρόμου των Πολυκυστικών Ωοθηκών (PCOS).

1. Οικογενειακή κατανομή του συνδρόμου.

Η οικογενειακή κατανομή των φαινοτύπων PCOS και των μεταβολικών και αναπαραγωγικών διαταραχών του, έχει διαπιστωθεί εδώ και αρκετό καιρό (119). Ενώ η οικογενής κατανομή του PCOS υποστηρίζει δυναμικά τον ρόλο των γενετικών παραγόντων στην ανάπτυξη του PCOS, η ετερογένεια των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών σε διαφορετικές οικογένειες, αλλά μερικές φορές ακόμα και μέσα στην ίδια οικογένεια, υποβαθμίζει τον ρόλο των περιβαλλοντικών παραγόντων. Το PCOS εμφανίζει διαφορετικούς φαινοτύπους και ο ακριβής τρόπος κληρονομικότητας έχει ακόμη αρκετό δρόμο ώστε να εξηγηθεί πλήρως (120,121). Οικογενειακές μελέτες του PCOS αποκάλυψαν κυρίως την μορφολογία των ωοθηκών, τις διαταραχές εμμήνου ρύσεως, τα συμπτώματα της υπερανδρογοναιμίας (122-128). Ο Cooper και συνεργάτες του το 1968 σε μια μεγάλη μελέτη περιέγραψαν πρώτοι την επίπτωση της ολιγομηνόρροιας και των πολυκυστικών ωοθηκών σε συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με PCOS σε σύγκριση με μια ομάδα ελέγχου (119). Σε αυτή την μελέτη ο προτεινόμενος μηχανισμός της κληρονομικότητας ήταν αυτοσωματικά κυρίαρχος με μειωμένη διεισδιτικότητα. Ο Givens και οι συνεργάτες του το 1988 έχουν αναφέρει μια σειρά περιπτώσεων βασισμένων σε οικογενειακές μελέτες, οι οποίες χρησιμοποίησαν ως διαγνωστικά κριτήρια την υπερτρίχωση, την ολιγομηνόρροια και τις πολυκυστικές ωοθήκες

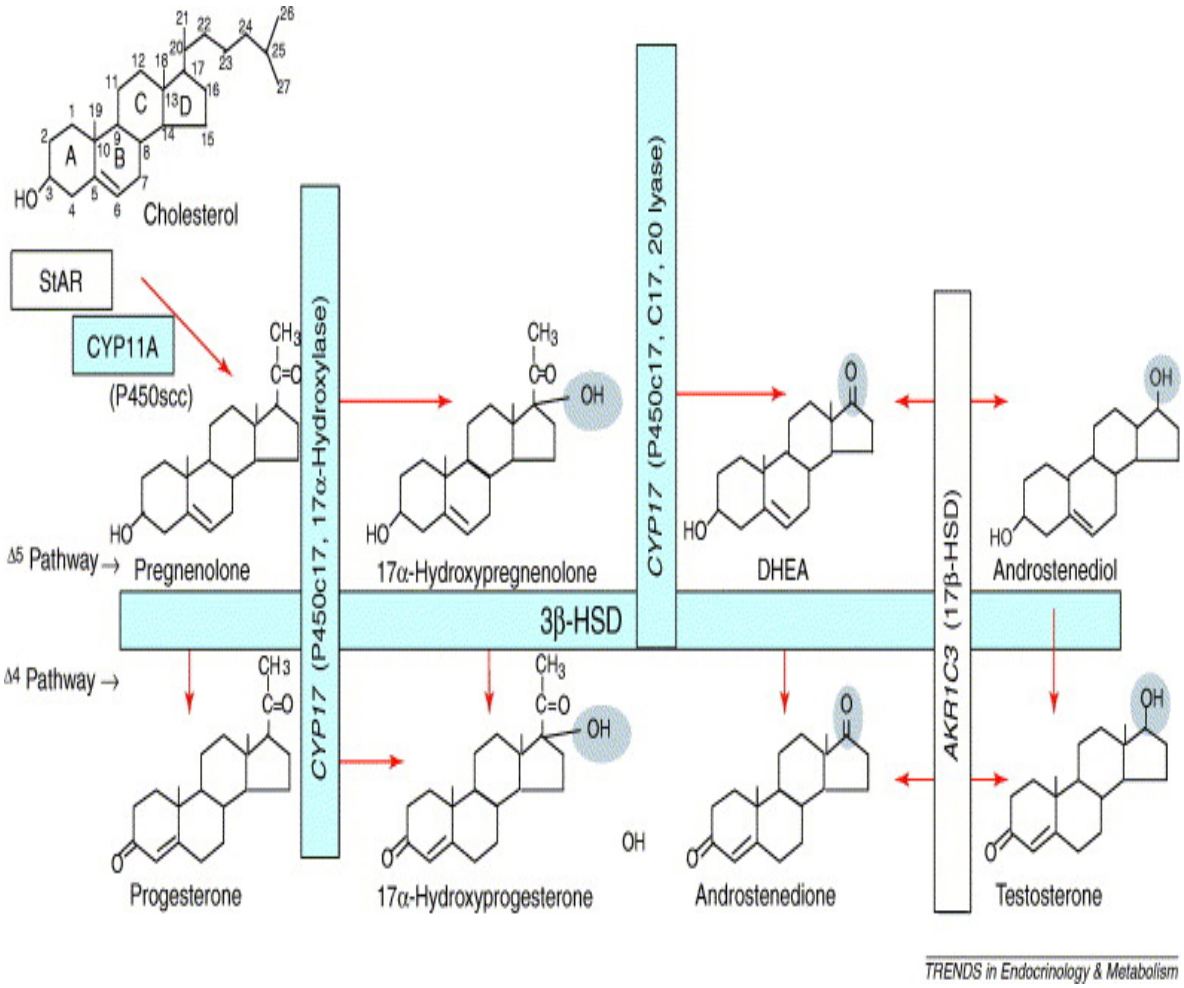
(129,130) και ανέδειξαν μια οικογενειακή συσσώρευση των υπερανδρογοναιμικών και μεταβολικών διαταραχών. Αυτές οι μελέτες πρώτες απεκάλυψαν μερικές από τις μεταβολικές διαταραχές, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η αντίσταση στην ινσουλίνη, οι διαταραχές λιπιδίων, η υπέρταση, και η αρτηριοσκλήρυνση. Η ολιγοσπερμία και η αυξημένη έκκριση της LH βρέθηκε σε μερικούς άρρενες της ομάδας μελέτης να συνδέεται με το X χρωμόσωμα (130,131). Ο Ferriman και ο Purdie το 1979 μελέτησαν μια μεγάλη ομάδα τριχωτών γυναικών με ή χωρίς ολιγομηνόρροια και τις οικογενειές τους (122). Αυτοί ανέφεραν μια υψηλότερη επίπτωση της τριχοφυίας, της ολιγομηνόρροιας και της στειρότητας σε πρώτου βαθμού συγγενείς, συγκρινόμενες με μη τριχωτές γυναίκες της ομάδας ελέγχου. Ένα ερωτηματολόγιο απεκάλυψε αυξημένη αλωπεκία σε άνδρες συγγενείς (122). Ο Lunde και οι συνεργάτες του το 1989 μελέτησαν οικογένειες 132 γυναικών από την Νορβηγία οι οποίες ταυτοποιήθηκαν μετά από ωοθηκεκτομή και οι οποίες είχαν 2 ή περισσότερα από τα ακόλουθα συμπτώματα: 1) διαταραχές εμμήνου ρύσεως, 2) υπερτρίχωση, 3) στειρότητα και/ή παχυσαρκία (123). Αυτοί επίσης συνέκριναν τις γυναίκες με την ομάδα ελέγχου και τις οικογένειες τους και βρήκαν ένα σημαντικά υψηλό ποσοστό πρόωρης αλωπεκίας και αυξημένης αλωπεκίας ανάμεσα σε άρρενες συγγενείς (123). Χρησιμοποιώντας τα κριτήρια του NIHCD (National Institute of Child Health and Human Development conference) 1990 για την διάγνωση του PCOS οι Kahsar-Miller και συνεργάτες τους το 2001 σε γυναίκες και αδελφές ασθενών με PCOS ανέφεραν ποσοστά 24% και 32% αντίστοιχα (127). Ο Legro και οι συνεργάτες του το 1998 έδειξε ότι 22% των αναπαραγωγικής ηλικίας αδελφών γυναικών με PCOS εκπλήρωναν τα διαγνωστικά κριτήρια του

PCOS, ενώ το 24% είχαν αυξημένα επίπεδα τιμών τεστοστερόνης και DHEAS με φυσιολογική έμμηνο ρύση (126). Αναφέρθηκαν 16% και 8% αντίστοιχα ποσοστά επίπτωσης σε αδελφές και μητέρες ασθενών με PCOS (130). Στοιχεία για την κληρονομικότητα των μεταβολικών φαινοτύπων όπως η λειτουργία των β-κυττάρων και η αντίσταση στην ινσουλίνη αναφέρθηκαν σε οικογενειακές μελέτες στο PCOS. Μελετώντας τις οικογένειες πέντε ασθενών με PCOS ο Norman και οι συνεργάτες του το 1992 ανέφεραν ότι αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης ήταν συνήθη ανάμεσα σε πρώτου βαθμού συγγενείς (131). Ο Legro και οι συνεργάτες του το 2002 ανέφεραν ότι νοσήσαντες αδελφές γυναικών με PCOS (τα οποία πληρούσαν τα κριτήρια για την διάγνωση του PCOS με υπερανδρογοναιμία) είχαν αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης και χαμηλό λόγο γλυκόζης νηστείας προς ινσουλίνη νηστείας (132) και οι αδελφοί των γυναικών με PCOS είχαν αυξημένα επίπεδα δευδροεπιανδροστερόνης (DHEA) (133). Έχει επίσης αναφερθεί ότι μητέρες και πατέρες ασθενών με PCOS έχουν αυξημένη επίπτωση διαταραχής ανοχής γλυκόζης και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 εκεί που αδελφοί και αδελφές εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη συγκρινόμενη με παρόμοιας BMI και ηλικίας ομάδας ελέγχου υγιών ατόμων (131).

2. Υποψήφια γονίδια για το PCOS.

α. Γονίδια αφορώντα στην ωοθηκική και επινεφριδιακή στεροειδογένεση.

Η συχνότερη βιοχημική ανωμαλία σε γυναίκες με PCOS είναι η υπερανδρογοναιμία. Για αυτό το λόγο οι ερευνητές έχουν από καιρό προσπαθήσει να εντοπίσουν μια σύνδεση ή μια συσχέτιση μεταξύ του PCOS και των γονιδίων τα οποία αναμιγνύονται στην βιοσυνθετική οδό **(Εικόνα 2)**. Τα σχετικότερα γονίδια τα οποία αφορούν την στεροειδογένεση CYP11α, CYP21, CYP17 και CYP19 έχουν αντιφατικές ιδιότητες και συζητούνται παρακάτω.



Εικόνα 2 : Βιοσύνθεση των στεροειδών ορμόνων. Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται τα ένζυμα που μετέχουν στην σύνθεση των στεροειδών ορμονών, τα υποστρώματα των ενζύμων αυτών καθώς και τα προϊόντα των αντιδράσεων.

β. Γονίδιο CYP11α.

Η επινεφριδιακή και ωοθηκική στεροειδογένεση ξεκινά με μετατροπή της χοληστερόλης σε προγεστερόνη, η οποία καταλύεται από το κυτόχρωμα P450 το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP11α το οποίο βρίσκεται στο 15q24 (135). Αυτή η μετατροπή είναι ένα βήμα καθοριστικό για την στεροειδογένεση. Ο Gharani και οι συνεργάτες του το 1997 διεξήγαγαν μια μελέτη συσχετισμού η οποία περιελάμβανε 97 γυναικες με PCOS και έδειξαν ότι υφίσταται μια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των επιπέδων τεστοστερόνης ορού και των αλληλομόρφων ενός VNTR (variable tandem repeats) πολυμορφισμού (tttta)n της 5΄αμετάφραστης περιοχής (UTR) του mRNA του γονιδίου CYP11α. Δύο ανεξάρτητες μεταγενέστερες μελέτες από την Ελλάδα (136) και την Κίνα (137), αντίστοιχα, επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα αυτά και υποστήριξαν τον ρόλο του CYP11α και του PCOS.

Αν και αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι τα αλληλόμορφα του CYP11α παίζουν ένα ρόλο στην αιτιολογία της υπερανδρογοναιμίας και/ή στο PCOS, ακόλουθες μελέτες συμπεριλαμβανομένης και μίας με ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων από το Hv. Βασίλειο και την Φιλανδία (138) έχουν αποτύχει να εντοπίσουν μια σημαντική σύνδεση ή συσχετισμό μεταξύ του γενετικού τόπου CYP11α και/ή του αριθμού των πολλαπλών επαναλήψεων στα αλληλόμορφα του γονιδίου με το PCOS (139-142). Παρότι οι τελευταίες μελέτες υποβίβασαν τη σημασία του, το CYP11α τουλάχιστον εν μέρει είναι ένα εν δυνάμει υποψήφιο γονίδιο για την παθογένεια του PCOS και περαιτέρω έρευνες απαιτούνται λόγω των αντικρουομένων αποτελεσμάτων.

γ. Γονίδιο CYP21.

Ένα απο τα κύρια βήματα στην ωοθηκική και επινεφριδιακή στεροειδογένεση είναι η μετατροπή της 17-υδροξυπρογεστερόνης σε 11-δεσοξυκορτιζόλη ή οποία καταλύεται από την 21-υδροξυλάση, ένα ένζυμο το οποίο κωδικοποιείται από το CYP21. Η ανεπάρκεια αυτού του ενζύμου, το οποίο παρουσιάζει αυτοσωματική υπολλειπόμενη κληρονομικότητα, είναι υπεύθυνη για πολλές περιπτώσεις συγγενούς υπερπλασίας των επινεφριδίων ενώ και τα αυξημένα επίπεδα 17-υδροξυπρογεστερόνης στον ορό σχετίζονται με αυτή την ανεπάρκεια. Γυναίκες με λειτουργική υπερανδρογοναιμία ή PCOS έχουν συνήθες εύρημα αυξημένη απόκριση 17-υδροξυπρογεστερόνης μετά από διέγερση με ACTH (143). Επιπλέον, ασθενείς οι οποίοι είναι ετεροζυγώτες για μεταλλάξεις στο γονίδιο του CYP21 εμφανίζουν ένα κλινικό φαινότυπο ο οποίος μοιάζει με PCOS (144). Οι μεταλλάξεις του CYP21 έχουν ερευνηθεί ως ενεχόμενες στη παθογένεια των ασθενών με PCOS. Ο Witchel και οι συνεργάτες του το 1997 έδειξαν ότι παιδιά με πρόωρη εμμηναρχή και κορίτσια στην εφηβεία με υπερανδρογοναιμία ήταν ετεροζυγώτες για μεταλλάξεις στο CYP21 (145). Ωστόσο ο Escobar-Morreale και οι συνεργάτες του το 1999 δεν βρήκαν ξεκάθαρη σχέση μεταξύ του γονοτύπου του CYP21 και της λειτουργικής καταγωγής της υπερανδρογοναιμίας (146) και ο Glintborg και συνεργάτες το 2005 δεν βρήκαν σχέση μεταξύ των γυναικών με ιδιοπαθή υπερτρίχωση και PCOS (147). Πρόσφατα ο Witchel και οι συνεργάτες του το 2005 διεξήγαγαν μια αναδρομική μελέτη συσχέτισης που περιελάμβανε 114 ασθενείς με PCOS, η οποία δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ

των γονιδιακών συχνότητων της μετάλαξης του CYP21 των ασθενών με PCOS με ή χωρίς υπερανδρογοναιμία και της ομάδας ελέγχου (148). Εν κατακλείδι, μεταλλάξεις στο γονίδιο CYP21 δεν φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο κλειδί στην ανάπτυξη του PCOS.

δ. Γονίδιο CYP17.

Άλλα βήματα τα οποία καθορίζουν τον ρυθμό της ωοθηκικής και επινεφριδιακής βιοσύνθεσης των ανδρογόνων είναι η μετατροπή της πρεγνενολόνης και προγεστερόνης σε 17-υδροξυπρεγνενολόνη και 17-υδροξυπρογεστερόνη αντίστοιχα και από αυτά τα στεροειδή σε δευδροεπιανδροστερόνη και ανδροστενεδιόνη η οποία καταλύεται απο το ένζυμο P450c17. Αυτό το ένζυμο έχει δραστικότητες 17α-υδροξυλάσης και 17,20-λυάσης και κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP17 το οποίο εντοπίζεται στο 10q24.3 (149,150). Αρχικά είχε προταθεί ότι μια υπερβολική επινεφριδιακή και ωοθηκική απόκριση και μια αυξημένη ενζυμική δραστικότητα του P450c17 ήταν υπεύθυνα για τα υψηλά επίπεδα ανδρογόνων σε ασθενείς με PCOS και λειτουργική υπερανδρογοναιμία (151,152). Ο Escobar-Morreale και οι συνεργάτες του το 1994 πρότειναν ότι οι περισσότερες υπερανδρογοναιμικές γυναίκες εμφάνιζαν αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου P450c17 σε περιοχές των ωοθηκών και των επινεφριδίων (153). Σε συμφωνία με αυτές τις μελέτες ο Wickenheisser και οι συνεργάτες του το 2004 ανέφεραν αυξημένη έκφραση του P450c17 και αυξημένη ενζυμική δραστικότητα στα κύτταρα της θήκης στις ωοθήκες γυναικών με PCOS καθώς και αυξημένη αυξημένη ενεργοποίηση

(transactivation) του υποκινητή του CYP17 από trans ρυθμιστικά στοιχεία (150,154). Σε μια άλλη μελέτη ο Carey και οι συνεργάτες του το 1994 αναγνώρισαν ένα σπάνιο σημειακό νουκλεοτιδικό πολυμορφισμό (T/C) στην θέση -34 του υποκινητή του γονιδίου CYP17, ο οποίος προσδίδει αυξημένη επιδεκτικότητα στην έναρξη του PCOS (155). Ακόμα, η Διαμάντη-Κανδαράκη και οι συνεργάτες της το 1999 επιβεβαίωσαν αυτό το εύρημα σε Έλληνες ασθενείς με PCOS (156), ενώ ακόλουθες μελέτες έχουν αποτύχει να αναδείξουν μια σημαντική σύνδεση ή σχέση μεταξύ CYP17 και PCOS (157-159).

Αν και τα μέχρι τώρα στοιχεία δείχνουν ότι το CYP17 δεν είναι το δυνατότερο υποψήφιο γονίδιο για το PCOS, θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η μεταφραστική ρύθμιση του γονιδιακού προϊόντος μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην παθοφυσιολογία του PCOS. Επειδή η φωσφορυλίωση της σερίνης αναμιγνύεται στην μεταφραστική ρύθμιση της δραστικότητας της 17,20 λυάσης (160), προτάθηκε ότι η μεταφραστική υπερφωσφορυλίωση της σερίνης υπολείπεται του P450c17 μιας ελαττωματικής κινάσης και μπορεί να αυξάνει την δραστικότητα του ενζύμου της 17,20 λυάσης (160,161). Ενδιαφέρον είναι επίσης ότι η ανάδειξη της φωσφορυλίωσης της σερίνης της β- αλυσίδας του υποδοχέα της ινσουλίνης, προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη in vitro (161,162). Άλλο ένα ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι 50% των γυναικών με PCOS οι οποίες είχαν υπερανδρογοναιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη είχαν υπερφωσφορυλιωμένη σερίνη στους υποδοχείς ινσουλίνης (163). Έτσι θεωρήθηκε, ότι μια μονήρης βλάβη παράγει στις γυναίκες με PCOS τόσο την αντίσταση στην ινσουλίνη, όσο και την υπερανδρογοναιμία (164). Συνολικά αυτά τα δεδομένα παρέχουν ένα ενθαρρυντικό στοιχείο της

υπόθεσης της σερίνης ως αιτίου του PCOS, ωστόσο αυτό πρέπει να αποδειχθεί.

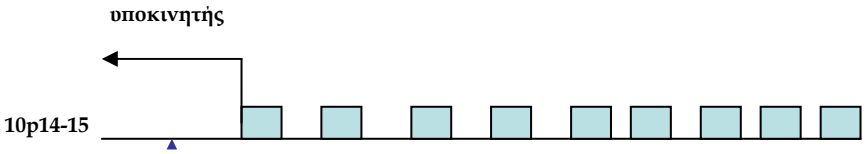
ε. Γονίδιο CYP19.

Ένα ενζυμικό σύμπλεγμα το οποίο καλείται αρωματάση μετατρέπει τα C19 στεροειδή (ανδρογόνα) σε C18 στεροειδή (οιστρογόνα). Αυτό το ενζυμικό σύμπλεγμα αποτελείται από την αρωματάση του κυτοχρώματος (P450αρωμ), την NADPH αναγωγάση του κυτοχρώματος P450 (165). Η P450αρωμ κωδικοποιείται από το CYP19 το οποίο εντοπίζεται στο 15p21.1 (166). Η ανεπάρκεια της αρωματάσης έχει αναφερθεί σε ένα αριθμό ασθενών με υπερανδρογοναιμία (167,168). Ανοσοιστοχημικές μελέτες των πολυκυστικών ωοθηκών δεν μπόρεσαν να αποκαλύψουν κάποια δραστικότητα της αρωματάσης στα διαφόρων μεγεθών ωοθυλάκια του άντρου (169). Ο Erickson και οι συν. το 1979 έδειξαν ότι τα κοκκιωματώδη κύτταρα τα οποία ελήφθησαν από μετρίου μεγέθους ωοθυλάκια γυναικών με PCOS είχαν μικρή δραστικότητα αρωματάσης (170). Παρομοίως ο Jakimiuk και συν. το 1998 έδειξαν πως όταν συγκρίνονταν με ωοθυλάκια της ομάδας ελέγχου, όλα τα PCOS ωοθηλάκια περιείχαν χαμηλές ποσότητες P450αρωμ mRNA,οιστραδιόλης και χαμηλή διεγερμένη βιοδραστικότητα της αρωματάσης (171). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η δραστικότητα της αρωματάσης μπορεί να ελαττωθεί σε ασθενείς με PCOS και ότι η πιθανή υπερανδρογοναιμία εξαιτίας αυτής της μειωμένης δραστικότητας μπορεί να συνεισφέρει στην ανώμαλη ωοθηκική ανάπτυξη. Εάν το CYP19 είναι ένα υποψήφιο γονίδιο για την παθογένεια του PCOS ή της υπερανδρογοναιμίας πρέπει να διερευνηθεί.

Μελέτες οι οποίες αφορούν τακτικό έλεγχο για μεταλλάξεις και σύνδεση δεν αποκάλυψαν κάποιο στοιχείο, ότι η ποικιλία του CYP19 συμμετέχει στην αιτιολογία του PCOS (172). Ωστόσο μελέτες συσχέτισης οι οποίες χρησιμοποιούν SNPs και απλοτύπους έδειξαν συσχέτιση με τα συμπτώματα του PCOS και τα επίπεδα τεστοστερόνης του ορού (173).

στ. Γονίδιο HSD17B5

Η 17-β υδροξυστεροειδική Δεϋδρογενάση HSD17B5 (or AKR1C3, MIM 603996) είναι ένα μέλος της υπεροικογένειας αλδο-κέτο ρεδουκτάσης και αποτελείται από διάφορα ένζυμα με πολλαπλές λειτουργίες τα οποία διαφέρουν τόσο στην έκφραση στους ιστούς όσο και στην ειδίκευση του υποστρώματος (174). Είναι το υπεύθυνο ένζυμο για την αναγωγή της ανδροστενεδιόνης σε τεστοστερόνη στα κύτταρα της ωοθήκης και των επινεφριδίων τα οποία είναι οι κύριες πηγές τεστοστερόνης στις γυναίκες (174, 175). Προσφάτως αναφέρθηκε ότι ένας νέος σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός στη θέση -71 του υποκινητή του γονιδίου HSD17B5 (ref SNP ID: rs3763676) σχετίζεται με το PCOS και με υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης (174) **(Εικόνα 3)**. Ωστόσο επόμενες μελέτες δεν επαλήθευσαν τον προαναφερθέντα συσχετισμό με την υπερανδρογοναιμία (175, 176), σε γυναίκες με PCOS (175) και σε κορίτσια με καθυστερημένη ενήβωση (176).



➢ **Γειτνιάζει με τη θέση πρόσδεσης των γενικών μεταγραφικών παραγόντων Sp1/Sp3 και αυξάνει την συγγένεια πρόσδεσης τους για τον υποκινητή *in vitro.***

Εικόνα 3 : Ο σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός A-71G στο γονίδιο HSD17B5.

3. Γονίδια σχετίζόμενα με ορμονικά αποτελέσματα των στεροειδών ορμονών.

α. Γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων.

Όλα τα ανδρογόνα λειτουργούν μέσω του υποδοχέα των ανδρογόνων και αυτός ο υποδοχέας ανήκει στην ομάδα των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων. Ο υποδοχέας των ανδρογόνων κωδικοποιείται από το γονίδιο (AR) το οποίο εντοπίζεται στο Xq11-12 (178) και αποτελείται από 3 δομικές περιοχές (domains): Την περιοχή ενεργοποίησης, την περιοχή σύνδεσης του DNA, και την περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (ligand). Ένας πολυμορφισμός VNTR ο οποίος αποτελείται από επαναλήψεις CAG (από 11 έως 38 επαναλήψεις, με μέσο όρο 20) στο εξώνιο 1, κωδικοποιεί μια αλυσίδα πολυγλουταμίνης στο αμινοτελικό άκρο της διαδραστικής περιοχής και τοποθετείται στο AR (179). Η μεταγραφική ενεργοποίησηση του υποδοχέα των ανδρογόνων σχετίζεται αντιστρόφως με τον αριθμό των επαναλήψεων CAG (180). Ποικιλίες αυτών των επαναλήψεων, ακόμα και μέσα στά φυσιολογικά όρια (11-38 CAG), έχουν συσχετισθεί με πολλές διαταραχές οι

οποίες σχετίζονται με χαμηλές ή υψηλές ανδρογονικές δράσεις (181-184). Έτσι, ο ελαττωμένος αριθμός επαναλήψεων CAG (κάτω από 11) που αυξάνει την μεταγραφική ενεργοποίηση του υποδοχέα των ανδρογόνων μπορεί να εξηγήσει μερικώς τον φαινότυπο PCOS με φυσιολογικά επίπεδα ανδρογόνων και συμπτώματα υπερανδρογοναιμίας (185). Πάντως ο Urbanek και συν. το 1999 δεν μπόρεσε να εντοπίσει κάποια συσχέτιση μεταξύ του VNTR και του PCOS (70). Παρομοίως ο Mifsud και συν. το 2000 δεν βρήκε διαφορές μεταξύ των ανωοθυλακιορηκτικών ασθενών με PCOS και της ομάδας ελέγχου για την κατανομή των συχνοτήτων των αλληλομόρφων των CAG επαναλήψεων (185). Αντιθέτως ο Hickey και συν. το 2002 έδειξαν μια σημαντικά υψηλότερη συχνότητα αλληλομόρφων με μακρύτερες CAG επαναλήψεις (πάνω από 22 επαναλήψεις) για μη γόνιμες ασθενείς PCOS σε σύγκριση με γόνιμες γυναίκες (186). Πράγματι και οι δύο αυτές μελέτες έδειξαν μια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων τεστοστερόνης και των επαναλήψεων CAG στον υποδοχέα AR. Επιβεβαιώνοντας τις πιο πάνω αναφορές ο Jaaskelainen και συν. το 2005 ανέφεραν ότι οι επαναλήψεις CAG δεν συμβάλλουν στην εμφάνιση του PCOS (187). Επίσης δεν βρήκαν καμμία συσχέτιση μεταξύ του VNTR και του BMI ή των επιπέδων τεστοστερόνης ορού (187). Ως αποτέλεσμα κανένα ουσιαστικό στοιχείο δεν υπάρχει μεταξύ του ρόλου του AR στην παθογένεια του PCOS.

β. Γονίδιο της SHBG.

Η SHBG ρυθμίζει την πρόσβαση των ανδρογόνων στα όργανα στόχους. Τα επίπεδα της SHBG ορού είναι συνήθως χαμηλά σε ασθενείς με

υπερανδρογοναιμία, συνεισφέροντας στην αυξημένη διαθεσιμότητα των ανδρογόνων στους ιστούς (188). Η ανθρώπινη SHBG αποτελείται από μία γλυκοπρωτείνη η οποία παράγεται από τα ηπατοκύτταρα και κωδικοποιείται από ένα γονίδιο 4 Kb στο 17p12-p13 (189,190). Ένας πεντανουκλεοτιδικός πολυμορφισμός ο οποίος επαναλαμβάνεται (TAAA)n στον υποκινητή (promoter) του γονιδίου της ανθρώπινης SHBG έχει περιγραφεί (191). Αυτός ο πολυμορφισμός έχει επίσης αναδειχθεί ότι επηρεάζει την μεταγραφική δραστικότητα του γονιδίου της SHBG (191). Κάτω από το φώς αυτών των δεδομένων, έχει προταθεί ότι αυτός ο λειτουργικός πολυμορφισμός μπορεί να συμβάλλει σε εξατομικευμένες διαφοροποιήσεις των επιπέδων της SHBG και με αυτόν τον τρόπο να επηρεάζει την πρόσβαση των ανδρογόνων στα όργανα στόχους (192). Η Ξίτα και συν. το 2003 διερεύνησε εάν ο πολυμορφισμός (TAAA)n του γονιδίου της SHBG σχετίζεται με το PCOS και εάν οι πολυμορφισμοί του σχετίζονται με αλλαγές στα επίπεδα της SHBG του ορού. Από την μελέτη του Ελληνικού πληθυσμού αναφέρθηκε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επαναλήψεων του πολυμορφισμού και του PCOS (192). Σε αυτήν την μελέτη οι PCOS ασθενείς έφεραν περισσότερες από 8 επαναλήψεις ενώ η ομάδα ελέγχου χωρίς υπερανδρογοναιμία εμφάνισε υψηλότερη συχνότητα αλληλομόρφων $(TAAA)_{<8}$τα οποία έφεραν λιγότερες από 8 επαναλήψεις**.** Εκτός αυτού, ασθενείς με PCOS οι οποίοι έφεραν $(TAAA)_{>}$ αλληλόμορφο είχαν χαμηλότερα επίπεδα SHBG. Ωστόσο ο Urbanek και συν. το 1999 δεν βρήκε κάποια συσχέτιση ή σύνδεση μεταξύ του επιτόπου της SHBG και του PCOS (70). Με βάση τα μέχρι τώρα στοιχεία μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το γονίδιο της SHBG είναι ένα εν δυνάμει υποψήφιο γονίδιο στην παθογένεια των PCOS.

4. Γονίδια αφορώντα στην δράση και ρύθμιση των γοναδοτροπινών.

α. Η LH και τα γονίδια των υποδοχέων.

Τόσο τα επίπεδα της LH όσο και η δράση της LH παρατηρούνται συχνά διαταραγμένα σε γυναίκες με PCOS και αυτές οι διαταραχές σχετίζονται με ανωορρηξία ως αποτέλεσμα της δράσης της LH στην ωρίμανση των ωοθυλακίων (193,194). Έτσι το γονίδιο που κωδικοποιεί την β-υποομάδα της LH και είναι υπεύθυνο για την ειδικότητα της LH έχει διερευνηθεί στους ασθενείς PCOS.

Αρχικά, μια ανοσολογικά διαταραγμένη μορφή της LH με δύο σημειακές μεταλλάξεις, Trp8Arg και Ilg15Thr αναγνωρίσθηκε στην β-υποομάδα της LH (195). Ακολούθως δείχθηκε ότι αυτές οι μεταλλάξεις είναι παγκοσμίως συνήθεις πολυμορφισμοί με επίπτωση 15% (196). Επιπροσθέτως αυτοί οι πολυμορφισμοί παρήγαγαν δομικές αλλαγές στην ποικιλία μορίων LH (v-LH) (197) και προκάλεσαν in vitro αυξημένη δραστικότητα και μειωμένη in vivo ημίσεια ζωή, όταν συγκρίνονταν με την μη μεταλλαγμένη μορφή (198). Ωστόσο η in vivo δραστικότητα της v-LH δεν μπορούσε να εξηγηθεί. Για να γίνει κατανοητή η σχέση του v-LH των ασθενών με PCOS ο Rajkhowa και συν. το 1995 διερεύνησαν τις επιπτώσεις του v-LH τόσο σε υγιείς γυναίκες όσο και σε ασθενείς με PCOS και βρήκε ότι η εμφάνιση αυτών των μεταλλάξεων στην β-υποομάδα του γονιδίου της LH δεν ήταν υψηλότερη στην

ομάδα του PCOS σε σύγκριση με τις υγιείς γυναίκες (199). Από την άλλη πλευρά, η ανάλυση των υποομάδων αυτής της μελέτης αποκάλυψε ότι οι παχύσαρκες PCOS ασθενείς είχαν υψηλότερη συχνότητα της ετερόζυγης v-LH σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου των παχύσαρκων της ομάδας ελέγχου (199). Σε αντίθεση με το τελευταίο εύρημα ο Tapanainen και συν. το 1999 στην πολυκεντρική τους μελέτη ανέφεραν ότι οι παχύσαρκοι PCOS ασθενείς από την Ολλανδία, την Φιλανδία και τις ΗΠΑ, αλλά όχι από το Ηνωμένο Βασίλειο έχουν χαμηλότερη συχνότητα αυτού του τύπου του πολυμορφισμού (200). Αν και σε αυτή την μελέτη βρέθηκε ότι ο v-LH προστατεύει με κάποιο τρόπο τις παχύσαρκες γυναίκες από το να αναπτύξουν PCOS, άλλες μελέτες απέτυχαν να βρουν κάποια συσχέτιση (196,201,202).

Άλλος ένας τύπος της LH οφείλεται σε μια μονήρη μετάλλαξη, Gly102Ser στον β-υπότυπο του γονιδίου της σερίνης (203). Ο Ramanujam και συν. το 1999 μελέτησαν την μετάλλαξη αυτή σε 176 ασθενείς με διαταραχές εμμήνου ρύσεως και 200 Κινέζες από την Σιγκαπούρη με φυσιολογική ωοθηκική λειτουργία και την βρήκαν παρούσα μόνο σε 7 ασθενείς (201). Προσφάτως ο Takahashi και συν. το 2003 έδειξαν ότι διάφορα SNP’s στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου του β-υποτύπου της LH ήταν συχνότερες σε ασθενείς με ωοθηκική δυσλειτουργία συμπεριλαμβανομένων των PCOS από τις φυσιολογικής ωοθηκικής λειτουργίας γυναίκες (204).

Η υπόθεση ότι μια ενεργή μετάλλαξη στο γονίδιο του υποδοχέα της LH μπορεί να αποτελεί αίτιο της υπερανδρογοναιμίας σε ασθενείς με PCOS οι οποίες είχαν φυσιολογικές συγκεντρώσεις LH και αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων εξετάσθηκε. Χρησιμοποιώντας ανάλυση σύνδεσης (linkage analysis) σε οικογένειες με πολλές περιπτώσεις PCOS (205), δεν βρέθηκε κάποια

μετάλλαξη του γονιδίου στις προσβεβλημένες οικογένειες (205). Παρομοίως ο Urbanek και συν. το 1999 ανέφερε αρνητικά αποτελέσματα σε ένα σύνολο 37 υποψηφίων γονιδίων από 150 οικογένειες με PCOS (70).

Συμπερασματικά, τα λειτουργικά αποτελέσματα από αυτά τα v-LH παραμένουν ασαφή και φαίνεται να μην παίζουν κάποιο ρόλο κλειδί στην παθογένεια των PCOS ή στην γυναικεία υπογονιμότητα, αλλά περαιτέρω μελέτες απαιτούνται ώστε να προσδιοριστεί η φυσιολογική και παθοφυσιολογική σπουδαιότητα αυτού του τύπου της LH.

5. Γονίδιο της Φολλιστατίνης.

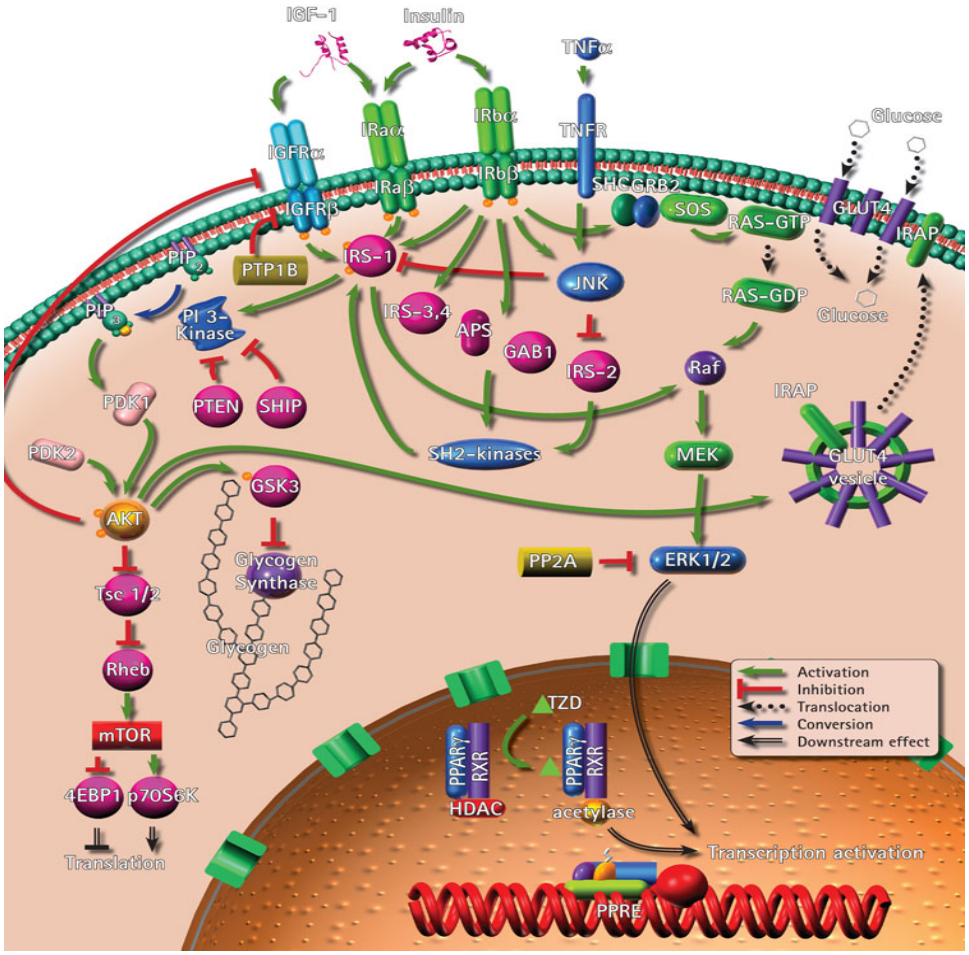
Η Φολλιστατίνη είναι μια μονομερής γλυκοπρωτείνη η οποία κωδικοποιείται από ένα μονήρες γονίδιο και σχετίζεται λειτουργικά μέσω του ρόλου της ως υψηλής συγγένειας δεσμευτική πρωτεΐνη για την ακτιβίνη (206). Η ακτιβίνη, μια διμερής γλυκοπρωτείνη η οποία ανήκει στην υπεροικογένεια TGF-β, επάγει την FSH, την έκκριση ινσουλίνης, την ωοθηκική ωρίμανση και αναστέλλει την LH-διεγειρόμενη ωοθηκική έκκριση ανδρογόνων (206). Ως δεσμευτική της ακτιβίνης πρωτεΐνη, η Φολλιστατίνη μπορεί να αναστρέψει κάθε μία από τις επαγόμενες από αυτή αποκρίσεις και in vivo και in vitro (206-209). Στην πραγματικότητα η υπερέκφραση της Φολλιστατίνης σε επίμυες οδήγησε σε καταστολή των επιπέδων FSH και σταμάτησε την ωοθηκική ωοθηλακιογένεση (207). Η σε μεγάλο βαθμό αδρανοποίηση της ακτιβίνης εξαιτίας της αυξημένης Φολλιστατίνης μπορεί να ελαττώσει της συγκεντρώσεις της FSH, να αναστείλει την ωοθηκική ωρίμανση, να αυξήσει την παραγωγή ανδρογόνων και να βλάψει την απελευθέρωση της ινσουλίνης.

Επειδή όλες αυτές οι αλλαγές είναι τυπικά χαρακτηριστικά του PCOS (210), το γονίδιο της Φολλιστατίνης έχει διερευνηθεί σαν υποψήφιο για το PCOS. Αρχικά ο Urbanek και συν. το 1999 εξέτασε ένα σύνολο από 37 υποψήφια γονίδια σε 150 οικογένειες με PCOS και ανέφερε στατιστικά σημαντική σύνδεση μεταξύ του γονιδίου της Φολλιστατίνης και του PCOS (70). Ωστόσο ακόλουθες μελέτες οι οποίες διενεργήθηκαν από τους ίδιους συγγραφείς δεν έδειξαν παρόμοια σύνδεση (211). Για να ανιχνεύσουν διαφοροποιήσεις του γονιδίου της Φολλιστατίνης έκαναν ανάλυση αλληλουχιών (sequencing) σε 85 γυναίκες από 19 οικογένειες PCOS ασθενών και αναγνώρισαν 17 μέρη τα οποία έφεραν διαφορετικές αλληλουχίες. Μόνο ένας από αυτούς τους πολυμορφισμούς ήταν συνήθης και αυτός ο τύπος δεν μπορούσε να μεταφραστεί (211). Αυτοί ανέφεραν επίσης παρόμοια έκφραση του mRNA του γονιδίου της Φολλιστατίνης σε καλλιεργημένους ινοβλάστες από γυναίκες PCOS και την ομάδα ελέγχου (211). Παρομοίως, δύο μελέτες οι οποίες συμπεριέλαβαν ασθενείς με PCOS από την Σιγκαπούρη (212) και την Ισπανία (213) δεν μπόρεσαν να βρουν καμιά σημαντική μετάλλαξη στις κωδικοποιημένες περιοχές του γονιδίου της Φολλιστατίνης.

6. Γονίδια εμπλεκόμενα στην έκκριση και δράση της ινσουλίνης.

Περίπου 2 δεκαετίες πριν, δείχθηκε ότι οι γυναίκες με PCOS είτε παχύσαρκες ή όχι, συγκρινόμενες με φυσιολογικές γυναίκες εμφανίζουν διαφόρου βαθμού αντίσταση στην ινσουλίνη και αντισταθμιστική υπερινσουλιναιμία (214). Ακολούθησαν αρκετά επιβεβαιωτικά στοιχεία για να γνωρίζουμε σήμερα ότι η

υπερινσουλιναιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη αποτελούν συνήθη χαρακτηριστικά των ασθενών με PCOS (165). Επομένως αρκετά γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην έκκριση και δράση της ινσουλίνης έχουν διερευνηθεί ως υποψήφια γονίδια στην παθογένεια των PCOS **(Εικόνα 4)**.



Εικόνα 4 : Ενδοκυττάριο μονοπάτι της μεταγωγής του σήματος της ινσουλίνης

α. Γονίδιο της ινσουλίνης.

Το INS τοποθετείται μεταξύ των γονιδίων της υδροξυλάσης της τυροσίνης και του IGF-II στο 11p15.5 και περιλαμβάνει πολλαπλές επαναλήψεις (tandem

repeats) (VNTR) οι οποίες βρίσκονται στην 5’ ρυθμιστική περιοχή του INS (215). Ο VNTR πολυμορφισμός ρυθμίζει τον μεταγραφικό ρυθμό του INS (216) και πιθανώς του γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί την IGF-II (217). Ο αριθμός των επαναλήψεων του INS VNTR βρίσκεται μεταξύ 26 και 200 και έχει τρείς κατηγορίες μεγεθών. Τα αλληλόμορφα κατηγορίας I με την μικρότερη πολυμορφική περιοχή, με μέσο μήκος 40 επαναλήψεων. Τα αλληλόμορφα κατηγορίας II έχουν μήκος 80 επαναλήψεων και είναι σπάνια στους λευκούς, ενώ η κατηγορία III έχει ένα μέσο μήκος 157 επαναλήψεων (218). Η μεταγραφική δραστικότητα της μεγαλύτερης πολυμορφικής περιοχής είναι μεγαλύτερη από αυτή της πιο μικρής (216). Εκτός της επίδρασης στην ρύθμιση της έκφρασης του INS, έχουν ενοχοποιηθεί και για την παθογένεια του διαβήτη τύπου-2 σε πολλές μελέτες (219,220).

Δεν είναι γνωστό εάν η υπερινσουλιναιμία η οποία ανιχνεύεται στις PCOS είναι αποτέλεσμα πρωτοπαθούς αντίστασης στην ινσουλίνη ή το άμεσο αποτέλεσμα της διαταραχής των β-κυττάρων του παγκρέατος, δεδομένου ότι έχουν αναφερθεί διαταραχές τόσο στην δράση της ινσουλίνης (214,221), όσο και στην λειτουργία των παγκρεατικών β-κυττάρων (222,223). Έτσι για να διευκρινισθεί η γενετική βάση του PCOS και να καθορισθεί η συσχέτιση με τις διαταραχές της έκκρισης και δράσης της ινσουλίνης, πρώτα ο Waterworth και συν. το 1997 εκτίμησαν την σύνδεση και την συσχέτιση των INS VNTR πολυμορφισμών σε οικογένειες με προσβεβλημένα μέλη με PCOS ή ανδρογεννητική αλωπεκία (224). Αυτοί βρήκαν μια συσχέτιση μεταξύ του PCOS και του τύπου των αλληλομόρφων στην INS VNTR περιοχή σε τρείς διαφορετικούς πληθυσμούς (224). Επιπλέον βρήκαν ότι τα αλληλόμορφα κατηγορίας I, ειδικά οι γονότυποι III/III σχετίζονταν με ανωοθηλακιορρηκτικό

PCOS σε δύο ανεξάρτητους πληθυσμούς και ήταν συχνότερες σε γυναίκες με PCOS και συμπτώματα από ότι σε αυτές χωρίς συμπτώματα . Επιπροσθέτως στην ίδια μελέτη δείχθηκε ότι ο γεωμετρικός μέσος όρος των συγκεντρώσεων της ινσουλίνης νηστείας του ορού ήταν σημαντικά υψηλότερος σε οικογένειες με κανένα στοιχείο σύνδεσης (linkage) (224). Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την ιδέα ότι οι VNTR πολυμορφισμοί έχουν ρόλο στούς φαινοτύπους PCOS με υπερινσουλιναιμία ή/και αντίσταση στην ινσουλίνη.

Σε μια περιεκτική μελέτη ο Urbanek και συν. το 1999 ωστόσο δεν βρήκαν κανένα στοιχείο σύνδεσης του INS και του PCOS καθώς και του συσχετισμού της τάξης III των αλληλομόρφων και της υπερανδρογοναιμίας (70). Αλλά η διαφορά αυτής της μελέτης από άλλες μελέτες, όπου τα υπερηχογραφικά κριτήρια χρησιμοποιούνται συνηθέστερα, ήταν ότι χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια επιλογής του NICHD. Παρομοίως ο Calvo και συν. το 2002 μελέτησαν τους INS VNTR πολυμορφισμούς σε Ισπανίδες με υπερανδρογοναιμία και απέτυχαν να δείξουν συσχέτιση με την ομάδα ελέγχου. (225).

β. Γονίδιο του υποδοχέα της ινσουλίνης (INSR).

Ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι μια ετεροτετραμερής γλυκοπρωτείνη η οποία αποτελείται από 2 α και 2 β υποομάδες και κωδικοποιείται από το INSR το οποίο τοποθετείται πάνω στο χρωμόσωμα 19 (226). Διάφορες μελέτες διενεργήθηκαν ώστε να αναγνωρισθεί εάν οι μεταλλάξεις του INSR μπορούσαν να εξηγήσουν την αντίσταση στην ινσουλίνη σε γυναίκες με PCOS. Αρχικά, η άμεση ανάλυση των αλληλουχιών (sequencing) του INSR

από 2 παχύσαρκες γυναίκες με PCOS δεν αποκάλυψε κάποιες μεταλλάξεις (227). Ακολούθως αναλύθηκε η αλληλουχία της περιοχής του INSR για την κινάση της τυροσίνης σε 22 υπερινσουλιναιμικούς ασθενείς με PCOS και ο Talbot και συν. το 1996 (228) διερεύνησαν τις μεταλλάξεις από την μοριακή ανίχνευση ολόκληρης της κωδικοποιημένης περιοχής του INSR σε 24 υπερινσουλιναιμικές γυναίκες με PCOS και σε καμία από αυτές δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές μεταλλάξεις που να συσχετίζουν την αντίσταση στην ινσουλίνη με τις PCOS (228). Προσφάτως σε μια μελέτη ο Urbanek και συν. το 2005 έδειξαν σύνδεση (linkage) με τις PCOS σε μια ομάδα από 367 οικογένειες που σε μεγάλο βαθμό κατάγονταν από την Ευρώπη (229). Μια μεγάλη περιοχή του χρωμοσώματος 19p13.2 διερευνήθηκε και η ισχυρότερη ένδειξη βρέθηκε με το D19S884, υποστηρίζοντας έτσι τα προηγούμενα ευρήματα αυτών των συγγραφέων (229). Σε μια άλλη μελέτη ο Siegel και συν. το 2002 εξέτασαν SNP στην περιοχή της κινάσης της τυροσίνης του INSR και βρήκαν συσχέτιση μεταξύ των αδύνατων ασθενών με PCOS. Αυτός ο SNP θα μπορούσε να αποτελεί προδιάθεση για PCOS, ή να είναι αποτέλεσμα ανισορροπίας στην σύνδεση (linkage disequlibrium) με κάποιο άλλο πολυμορφισμό του INSR, αλλά η σχέση χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για να επιβεβαιωθεί (230).

γ. Πρωτεΐνες του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης.

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα της ινσουλίνης η οποία ακολουθεί την δέσμευση με την ινσουλίνη απαιτεί την αυτοφωσφορυλίωση της β-υποομάδας του υποδοχέα της ινσουλινης (231). Η επακόλουθη ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης μετά την αυτοφωσφορυλίωση, φωσφορυλιώνει τα υποστρώματα του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS), όπως IRS-1 και IRS-2 (165). Ακολούθως το IRS-1 και IRS-2 δεσμεύει και ενεργοποιεί
δραστικές ουσίες όπως η 3-κινάση της φωσφοινοσιτίδης ώστε να προάγει μεταβολικές και μεταλλαξιογόνες δράσεις της ινσουλίνης. Όταν ο IRS-1 είναι δυσλειτουργικός ο IRS-2 είναι ο κύριος μεταβιβαστής για την ενδοκυτταρική μεταβίβαση του σήματος της ινσουλίνης, αλλά απαιτεί για ενεργοποίηση υψηλότερη συγκέντρωση ινσουλίνης (232).

Διάφοροι πολυμορφισμοί του IRS-1 και IRS-2 έχουν ενοχοποιηθεί για την αντίσταση στην ινσουλίνη. Ο Gly972Arg πολυμορφισμός του IRS-1 και ο Gly1057Asp για τον IRS-2 έχει δειχθεί ότι αυξάνει την ευαισθησία για εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (233,234). Ωστόσο αν και αρχικά κανένα στοιχείο για σύνδεση η συσχέτιση με PCOS του IRS -1 δεν βρέθηκε σε μια μελέτη οικογενειών η οποία διενεργήθηκε από τον Urbanek και συν. το 1999 (70), ο πιθανός ρόλος των SNP των IRS γονιδίων πρέπει περαιτέρω να διερευνηθεί. Οι Sir-Petermann και συν. το 2001 ανέφεραν υψηλή συχνότητα του Arg972 IRS-1 αλληλομόρφου σε ασθενείς με PCOS σε ένα πληθυσμό της Χιλής (235). Αντίθετα με αυτή την μελέτη, ο El Mkadem και συν. το 2001 δεν βρήκαν διαφορές στην κατανομή του IRS-1 Gly972Arg και IRS-2 Gly1057Asp αλληλομόρφων σε PCOS ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου, ωστόσο η μελέτη

έδειξε ότι ο Gly972Arg IRS-1 είχε μεγαλύτερη επίπτωση σε ασθενείς με ινσουλινοαντίσταση σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς ή με την ομάδα ελέγχου (236). Φαίνεται ότι η μετφορμίνη σε κυτταρικό επίπεδο υποβοηθεί την φωσφορυλίωση της τυροσίνης στην β-υποομάδα του υποδοχέα της ινσουλίνης και των IRS πρωτεϊνών και επίσης αυξάνει την ινσουλινοεξαρτόμενη και μη, πρόσληψη γλυκόζης μέσω της οικογένειας των πρωτεϊνών μεταφορέων (237). Συνολικά οι μελέτες συσχετισμού των IRSs με το PCOS και την αντίσταση στην ινσουλίνη εμφανίζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα όπως συμβαίνει και με τα άλλα υποψήφια γονίδια. Πρέπει όμως να τονισθεί ότι σε αυτές τις μελέτες οι πολυμορφισμοί των IRS φαίνεται να συσχετίζονται περισσότερο με την αντίσταση στην ινσουλίνη παρά με το PCOS.

δ. Γονίδιο της Καλπαΐνης 10 (Calpain 10).

Η καλπαΐνη-10 είναι μια πρωτεάση της κυστεΐνης η οποία παίζει ρόλο στην έκκριση και δράση της ινσουλίνης (238) και γενετικές μελέτες δείχνουν ότι παραλλαγές στο γονίδιο CAPN10 το οποίο την κωδικοποιεί σχετίζεται με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (239). Ο Gonzales και συν. το 2002 μελέτησαν τέσσερεις πολυμορφισμούς SNPs (SNP-19, SNP-43, SNP-44 και SNP-63 του CAPN10 σχετίζονται με το PCOS (240,241). Στις μελέτες αυτές βρέθηκε ότι ο SNP-44 σχετίζεται με PCOS σε Ισπανίδες (240,241). Παρόλα αυτά ο Haddad και συν το 2002 δεν επιβεβαίωσαν κανένα από τους 4 πολυμορφισμούς ότι έχει σχέση με το PCOS (242). Αυτά τα αντιφατικά αποτελέσματα δείχνουν την

ανάγκη μελέτης μεγαλύτερων πληθυσμών, οι οποίες θα έπρεπε να περιλαμβάνουν χιλιάδες, παρά εκατοντάδες ασθενείς.

7. Γονίδια αφορώντα στην ενεργειακή ομοιόσταση σχετιζόμενα με το PPARγ.

α. Τα γονίδια της λεπτίνης, του υποδοχέα αυτής και της αδιπονεκτίνης.

Ο λιπώδης ιστός έχει αναγνωρισθεί την τελευταία δεκαετία ως ενεργό ενδοκρινές όργανο το οποίο εκκρίνει μια ποικιλία από προϊόντα τα οποία ονομάζονται αδιποκυτοκίνες (adipocytokines) (243). Δεδομένου ότι ένα σημαντικό ποσοστό γυναικών με PCOS είναι υπέρβαρες και μερικές παθολογικά παχύσαρκες, τα γονίδια των συχνοτέρων αδιποκυτοκινών, όπως είναι η λεπτίνη και η αδιπονεκτίνη (adiponectin), έχουν διερευνηθεί ως ενεχόμενες στη παθογένεια του PCOS.

Ο Oksanen και συν. το 2000 μελέτησαν την αλληλουχία του γονιδίου της λεπτίνης σε μια μικρή ομάδα ασθενών με PCOS, αλλά απέτυχαν να ανιχνεύσουν κάποιες μεταλλάξεις στα κωδικοποιημένα εξόνια (244). Σε αυτή την μελέτη οι ερευνητές μελέτησαν και το γονίδιο του υποδοχέα της λεπτίνης και βρήκαν διάφορες παραλλαγές στα εξόνια 2, 4 και 12 καθώς και μια πεντανεοκλουοτιδική εισαγωγή (insertion) στην 3- μη μεταφρασμένη περιοχή (244). Ωστόσο οι συχνότητες των αλληλομόρφων σε αυτούς τους πολυμορφισμούς δεν διέφερε από ότι στον γενικό πληθυσμό (244).

Μετά τους πολυμορφισμούς αλληλουχίας, για το γονίδιο της αδιπονεκτίνης, οι περισσότερες μελέτες αφορούν δύο πολυμορφισμούς τον T45G στο εξόνιο 2 και τον G276T στο ιντρόνιο 2. Ξεκάθαρα δείχθηκε ότι αυτοί οι πολυμορφισμοί σχετίζονται με την παχυσαρκία, την αντίσταση στην ινσουλίνη και τον κίνδυνο για διαβήτη τύπου 2 (245-248). Ο San Milan και συν. το 2004 απέτυχαν να δείξουν συσχέτιση μεταξύ του PCOS και των δύο αυτών πολυμορφισμών του γονιδίου της αδιπονεκτίνης (249). Φαίνεται ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της αδιπονεκτίνης δεν παίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια του PCOS, ενώ εν μέρει έχουν κάποιο ρόλο στην φανοτυπική ποικιλομορφία του PCOS.

8. Γονίδιο του PPAR-γ.

Ο PPAR-γ είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στην λιπογένεση, και τον μεταβολισμό, ενώ είναι ένας λειτουργικός υποδοχέας για τις θειαζολιδινεδιόνες (TZDs) (250). Ο PPAR-γ εντοπίζεται στο 3p25 (251) και είναι ένα υποψήφιο γονίδιο για την ρύθμιση του μεταβολισμού του λιπώδους ιστού και επίσης ένα γονίδιο το οποίο προδιαθέτει σε παχυσαρκία και διαβήτη (252-254). Οι αγωνιστές του PPAR-γ, κυρίως οι θειαζολιδινεδιόνες (TZDs) προσφέρουν μια αποτελεσματική προσέγγιση στην θεραπεία του διαβήτη τύπου 2. Υπάρχουν δύο πολυμορφισμοί οι οποίοι έχουν διερευνηθεί σε διάφορους πληθυσμούς (255). Ο πρώτος είναι η αντικατάσταση C478T η οποία βρίσκεται στο εξόνιο 6 και ο δεύτερος πολυμορφισμός είναι η αντικατάσταση μιας προλίνης με αλανίνη στη θέση 12αα του εξονίου 2.

Ο Urbanek και συν. το 1999 δεν βρήκαν κανένα στοιχείο συσχέτισης με το PCOS (70). Σε μια άλλη μελέτη ο Hara και συν. το 2002 έδειξαν ότι ασθενείς

PCOS με αλληλόμορφα Pro/Ala είναι περισσότερο ινσουλινοευαίσθητες από αυτές με Pro/Pro (256). Προσφάτως ο Hahn και συν. το 2005 έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός Pro12Ala του γονιδίου PPAR-γ σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, καθώς και χαμηλή τριχοφυΐα σε γυναίκες με PCOS (257). Ο περιορισμένος αριθμός των πληθυσμών που έγιναν οι μελέτες και τα χαμηλής αυστηρότητας διαγνωστικά κριτήρια αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες στην σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Δ. Μέθοδοι οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε Γενετικές Μελέτες.

Δύο κύριες προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση γενετικών τόπων για το PCOS. Είναι 1) Μελέτες συσχέτισης όπου ένα προεξάρχων αλληλόμορφο αναμένεται να συναντάται συχνότερα στον πληθυσμό που νοσεί από ότι σε φυσιολογικά άτομα και 2) Μελέτες ανάλυσης γενετικής σύνδεσης (linkage) όπου οικογένειες που εμφανίζουν το προς μελέτη γνώρισμα διερευνώνται για το εάν ειδικοί γενετικοί δείκτες κατανέμονται ανεξάρτητα ή με σύνδεση (μαζί) με τον φαινότυπο. Στις μελέτες αυτές, ως γενετικοί δείκτες χρησιμοποιούνται γενετικοί πολυμορφισμοί. Με τον όρο πολυμορφισμός περιγράφονται τα αλληλόμορφα ενός γενετικού τόπου κάθε ένα από τα οποία έχει συχνότητα μεγαλύτερη από εκείνη που θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις και μόνο. Ένας γενετικός τόπος θεωρείται αυθαίρετα πολυμορφικός όταν το σπανιότερο αλληλόμορφο έχει συχνότητα 0,01 και επομένως η συχνότητα ετεροζυγωτίας είναι τουλάχιστον 0,02. Η εύρεση συσχέτισης ή σύνδεσης ενός πολυμορφισμού με κάποιο χαρακτηριστικό γνώρισμα ή διαταραχή δεν συνεπάγεται πάντοτε και

σχέση αιτιότητα μεταξύ των δυο αλλά μπορεί να είναι το αποτέλεσμα γενετικής σύνδεσης του πολυμορφισμού που χρησιμοποιείται κατά την ανίχνευση με τον γενετικό παράγοντα που πραγματικά ευθύνεται για την εμφάνιση της διαταραχής. Οι γενετικές μελέτες ανάλυσης σύνδεσης απαιτούν τη γνώση του προτύπου κληρονομικότητας για την διαδικασία ανάλυσης. Αυτές οι μελέτες είναι κατάλληλες για την ταυτοποίηση γονιδίων που ενέχονται σε μονογονιδιακές διαταραχές ή χαρακτηριστικά τα κληρονομούνται βάσει των νόμων της Μενδελικής κληρονομικότητας, αλλά δεν είναι ακατάλληλες για την διαλεύκανση του γενετικού υπόβαθρου πολυπαραγοντικών νόσων, όπως είναι το PCOS. Η ποικίλη διεισδυτικότητα και εκφραστικότητα είναι δύο παράγοντες οι οποίοι καθιστούν δυσχερείς τις μεθόδους συσχέτισης και σύνδεσης. Η συχνότητα των γονιδιωματικών στοιχειών η οποία χρησιμοποιήθηκε σε μελέτες σύνδεσης (linkage) καθορίζει την ανάλυση και την δύναμη χαρτογράφησης της μελέτης. Η προσέγγιση ανίχνευσης ολόκληρου του γονιδιώματος, η οποία χρησιμοποιεί σημειακούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (single nucleotide polymorphism) και την τεχνική των μικροσυστοιχιών, επιτυγχάνει την μεγαλύτερη ανάλυση στην γενετική χαρτογράφηση (134). Ακόμα δεν έχει δημοσιευθεί κάποια μελέτη με αυτή την τεχνική για το θέμα αυτό.

Ε. Μεταβολικό σύνδρομο, PCOS και επιπλοκές.

1. Ορισμός μεταβολικού συνδρόμου.

Ένα από τα μεγαλύτερα σύγχρονα ιατρικά προβλήματα είναι η συντελούμενη στις ανεπτυγμένες χώρες επιδημία παχυσαρκίας και οι δυσμενείς μεταβολικές επιπτώσεις που προκύπτουν από την περίσσεια του λιπώδους ιστού. Η περίσσεια του λιπώδους ιστού, δηλαδή η παχυσαρκία, ειδικά στο σπλαχνικό του τμήμα, συνδέεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη, την υπεργλυκαιμία, τη δυσλιπιδαιμία, την υπέρταση και τις προθρομβωτικές και προφλεγμονώδεις καταστάσεις. Το σύνολο αυτών των μεταβολικών χαρακτηριστικών χαρακτηρίζονταν αρχικά ως «σύνδρομο Χ» και τώρα ονομάζεται μεταβολικό σύνδρομο (258). Επιπροσθέτως της παχυσαρκίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη, το μεταβολικό σύνδρομο για να ορισθεί οφείλει να περιλαμβάνει τρία (3) ή περισσότερα από τα ακόλουθα κλινικά χαρακτηριστικά :

1) Υπέρταση άνω των 130/85mmHg,

2) Επίπεδα τριγλυκεριδίων άνω των 150mg/dL,

3) Επίπεδα HDL-χοληστερόλης μικρότερα των 50mg/dL,

4) Κοιλιακή παχυσαρκία μεγαλύτερη των 89cm,

5) Γλυκόζη νηστείας άνω των 110mg/dL.

Η συνολική επίπτωση του μεταβολικού συνδρόμου στις ΗΠΑ είναι 24% και αυξάνεται με την ηλικία (40% σε γυναίκες άνω των 60 ετών) (259).

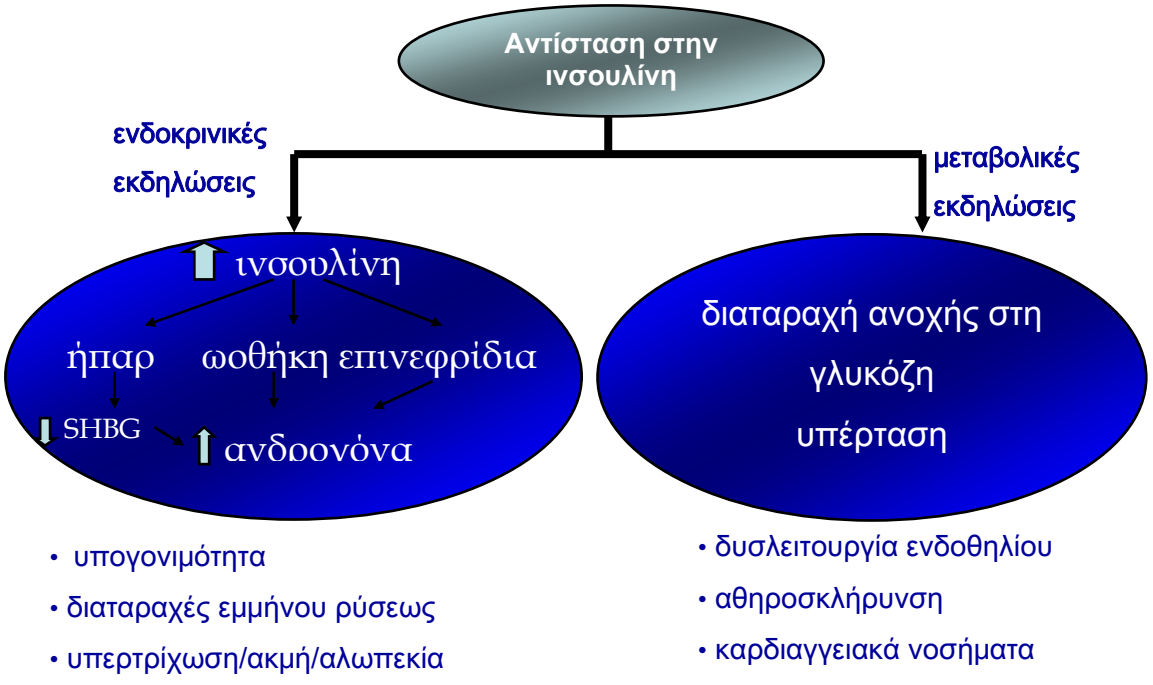
2. Μεταβολικό Σύνδρομο και PCOS.

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) θεωρείται σήμερα ως μια σημαντική διαταραχή του μεταβολισμού και της αναπαραγωγής. Σχετίζεται με παχυσαρκία, υπερινσουλιναιμία, αυξημένα επίπεδα LH, υπερανδρογοναιμία, υπερτρίχωση, ωοθηλακική ατρησία, μεγέθυνση των ωοθηκών με σχηματισμό κύστεων, ανωορρηξία και αμηνόρροια **(Εικόνα 5).** Η κλινική συσχέτιση μεταξύ της υπερινσουλιναιμίας και της ανωοθηκικής υπερανδρογοναιμίας είναι παγκόσμια και σε διαφορετικές εθνικές ομάδες (260). Συχνά σχετίζεται επίσης με μελανίζουσα ακάνθωση.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη σχετίζεται με αυξημένο κοιλιακό λίπος, διαταραχή ανοχής γλυκόζης, υπέρταση και δυσλιπιδαιμία (αυξημένα τριγλυκερίδια, μειωμένη HDL, αυξημένη LDL). Το PCOS προσβάλλει πολλά συστήματα και όργανα και κλειδί της παθογένειας του αποτελεί η υπερινσουλιναιμία. Λόγω της συνύπαρξης πολλών παραγόντων κινδύνου για καρδιοαγγειακά νοσήματα και ακόμα εξαιτίας της αθροιστικής τους δράσης οι γυναίκες με PCOS έχουν αυξημένο κίνδυνο για καρδιοαγγειακά νοσήματα (261). Στο μεταβολικό σύνδρομο υπάρχουν σοβαρές διαταραχές τόσο στην δράση όσο και στην έκκριση της ινσουλίνης, οι οποίες οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη τροποποιεί την αναπαραγωγική λειτουργία τόσο με άμεση δράση της ινσουλίνης στην στεροειδογένεση, όσο και διακόπτοντας τις οδούς σήμανσης της ινσουλίνης στο ΚΝΣ. Αυτές οι γνώσεις έχουν οδηγήσει σε νέα θεραπευτική προσέγγιση για το PCOS, τους ευαισθητοποιητές της ινσουλίνης. Η υπερανδρογοναιμία και η αντίσταση στην

ινσουλίνη συνυπάρχουν σε οικογένειες με PCOS κάτι που είναι σύμφωνο με την γενετική προδιάθεση αυτών των διαταραχών. Υπάρχουν στοιχεία για σύνδεση και συσχέτιση της υπερανδρογοναιμίας με ένα αλληλόμορφο ενός επιτόπου του χρωμοσώματος 19 στην περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της ινσουλίνης. Η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι ένα κύριο χαρακτηριστικό του PCOS, ανεξαρτήτως της ύπαρξης παχυσαρκίας (262,263). Οι περισσότερες γυναίκες με PCOS εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη. Η παχυσαρκία και το PCOS ασκούν προσθετική βλάβη στην ευαισθησία στην ινσουλίνη (264). Οι μοριακοί μηχανισμοί αυτής της βλάβης διαφέρουν από άλλες καταστάσεις με αντίσταση στην ινσουλίνη, κάτι που υποδεικνύει ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη έχει διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο (262).



Εικόνα 5 : Δράσεις της ινσουλίνης στο μεταβολικό σύνδρομο

Μελέτες στα λιποκύτταρα γυναικών με PCOS δείχνει ότι υπάρχει μια μετασυνδετική διαταραχή της επαγωγής του σήματος μετά την σύνδεση με τον υποδοχέα της ινσουλίνης και αυτή η παρατήρηση έχει προσφάτως επιβεβαιωθεί σε σκελετικούς μύες, οι οποίοι αποτελούν τον κύριο τόπο της ινσουλινοεξαρτόμενης πρόσληψης γλυκόζης (262). Μελέτες των υποδοχέων της ινσουλίνης από απομονωμένα κύτταρα ινοβλαστών δείχνουν ότι η διαταραχή του σήματος είναι αποτέλεσμα μείωσης της δραστικότητας της κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης, η οποία με την σειρά της συμβαίνει λόγω αυξημένης φωσφορυλίωσης της σερίνης του υποδοχέα. Ο παράγοντας ο οποίος προκαλεί αυτή την φωσφορυλίωση φαίνεται να είναι εξωτερικός του υποδοχέα της ινσουλίνης. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι μια κινάση της σερίνης είναι υπεύθυνη για αυτό το εύρημα, καθώς σε καλλιεργημένους ινοβλάστες του δέρματος από ασθενείς με PCOS, ένας μή ειδικός αναστολέας της κινάσης της σερίνης επαναφέρει στο φυσιολογικό την αυτοφωσφορυλίωση της τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης (265). Η διαταραχή αυτή του σήματος προκαλεί εκλεκτική αντίσταση στην ινσουλίνη, επηρεάζοντας τις μεταβολικές αλλά όχι και τις μεταλλακτικές δράσεις της ινσουλίνης (266). Η φωσφορυλίωση της σερίνης του ενζύμου P450c17α για τη βιοσύνθεση των ανδρογόνων αυξάνει τη δραστικότητά του. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι στο PCOS, η ίδια κινάση είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της σερίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα την αντίσταση στην ινσουλίνη, και του ενζύμου κυτόχρωμα P450c17α, με συνέπεια την υπερανδρογοναιμία. Η μία μελέτη, στην οποία ελέγχθηκε η υπόθεση αυτή, με γονιδιακή μεταφορά του κυτοχρώματος P450c17α σε ινοβλάστες δέρματος γυναικών με PCOS, δεν έδειξε αυξημένη

φωσφορυλίωση της σερίνης του κυτοχρώματος P450c17α, μολονότι οι ινοβλάστες παρουσίαζαν αυξημένη δραστικότητα της κινάσης της σερίνης (265). Τα αποτελέσματα όμως της μελέτης αυτής, μολονότι δεν στήριξαν, δεν αναίρεσαν την υπόθεση της κινάσης της σερίνης, δεδομένου ότι οι ινοβλάστες δεν είναι κύτταρα που παράγουν στεροειδή και ενδεχομένως να στερούνται ουσιαστικών συν-παραγόντων για τη φωσφορυλίωση του P450c17α. Κατά συνέπεια χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της παραπάνω υπόθεσης και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις κινάσες της σερίνης αποτελούν υψηλής προτεραιότητας υποψήφια γονίδια για το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

Στις ασθενείς με PCOS η ινσουλίνη δρα στον υποδοχέα της σε συνέργεια με την LH και διεγείρει την στεροειδογένεση στα κύτταρα της θήκης (267). Η ινσουλίνη συμβάλλει επίσης σε αυξημένη επινεφριδιακή παραγωγή ανδρογόνων στο PCOS, αυξάνοντας την ευαισθησία των επινεφριδίων στην ACTH (268). Ο Ek και οι συνεργάτες του το 2002 έχουν αναγνωρίσει στο λιπώδη ιστό ειδικές διαταραχές στην ρύθμιση της λιπόλυσης στο PCOS. Τα απομονωμένα υποδόρια κοιλιακά λιποκύτταρα (adipocytes) είναι ανθεκτικά στην επαγόμενη από κατεχολαμίνες λιπόλυση, εκεί που αυξημένη ευαισθησία παρατηρείται στα σπλαγχνικά λιποκύτταρα (adipocytes) στις γυναίκες με PCOS (269). Όπως οι διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης έτσι και οι μοριακοί μηχανισμοί των λιπολυτικών διαταραχών στο PCOS είναι μοναδικές. Αυτές οι διαταραχές είναι ανεξάρτητες της ύπαρξης παχυσαρκίας. Σε αντίθεση με τις μέσω των επινεφριδιακών υποδοχέων αλλαγές στην λιπόλυση, οι οποίες παρατηρούνται στο μεταβολικό σύνδρομο, στο PCOS υπάρχει μια μετασυναπτική αύξηση στην δραστικότητα της πρωτεϊνικής κινάσης Α. Η

αύξηση στην λιπόλυση του σπλαγχνικού λίπους οδηγεί σε αύξηση των ελευθέρων λιπαρών οξέων (FFA) στην πυλαία κυκλοφορία. Τα επίπεδα των FFA είναι οι κύριοι ρυθμιστές της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης. Επομένως η σπλαγχνική λιπόλυση μπορεί να είναι ένας μηχανισμός για την διαταραχή ανοχής γλυκόζης στο PCOS. Έχει βρεθεί ότι γυναίκες με PCOS μπορούν να ελαττώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και του καρδιοαγγειακού κινδύνου μέσω της άσκησης και της ελάττωσης του σωματικού τους βάρους και ακόμα ότι η χρήση φαρμάκων τα οποία μειώνουν την αντίσταση στην ινσουλίνη είναι επιβεβλημένη (273). Υπάρχουν πολύ λίγα στοιχεία τα οποία δείχνουν ότι οι γυναίκες με PCOS βρίσκονται σε αυξημένο καρδιοαγγειακό κίνδυνο ανεξαρτήτως της ύπαρξης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (271). Αυτό πιθανώς οφείλεται στην προστατευτική δράση των οιστρογόνων στους ανωοθηκικούς κύκλους παρά την παρουσία άλλων παραγόντων καρδιοαγγειακού κινδύνου. Ο βαθμός κατά τον οποίον το PCOS συνεισφέρει στην πρόωρη θνησιμότητα και θνητότητα σε γυναίκες με PCOS παραμένει προς το παρόν ασαφής. Είναι αμφισβητήσιμο εάν το PCOS ή η παχυσαρκία, η οποία είναι συχνό χαρακτηριστικό του συνδρόμου ή και τα δύο μαζί, είναι ο κύριος παράγοντας εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη σε γυναίκες με ιστολογικά τεκμηριωμένο PCOS (272). Οι περισσότερες μελέτες για την σχέση του PCOS με τα επίπεδα των λιπιδίων είναι αντικρουόμενες. Εξαίρεση αποτελούν τα επίπεδα της HDL τα οποία είναι χαμηλά στις γυναίκες με PCOS σε σχέση με την ομάδα ελέγχου του γενικού πληθυσμού και ανεξαρτήτως των κριτηρίων επιλογής (273). Η μακρά παρακολούθηση των γυναικών με PCOS οι οποίες θεραπεύτηκαν με ωοθηκεκτομή έδειξε ότι βρίσκονταν σε αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη είτε ήταν παχύσαρκες είτε όχι

(274). Τα κριτήρια του μεταβολικού συνδρόμου ποικίλουν και βασίζονται στην παρουσία τριών τουλάχιστον κριτηρίων σύμφωνα με τα κριτήρια N.C.E.P., W.H.O. και I.D.F. και συνεπώς ποικίλει και η επίπτωση του μεταβολικού συνδρόμου στις γυναίκες με PCOS, αναλόγως των κριτηρίων τα οποία χρησιμοποιούνται.

3. Διάγνωση της αντίστασης στην ινσουλίνη.

Ο καθορισμός του ποσοστού των γυναικών με PCOS που παρουσιάζει αντίσταση στην ινσουλίνη εξαρτάται από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται. Η καλύτερη μέθοδος ελέγχου της αντίστασης στην ινσουλίνη είναι η τεχνική της ευγλυκαιμικής αντλίας. Η μέθοδος αυτή είναι δύσκολη και χρησιμοποιείται μόνο για ερευνητικούς σκοπούς. Η συχνή λήψη δειγμάτων αίματος, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση γλυκόζης, δεν είναι, επίσης, πρακτική. Η πλέον δημοφιλής κλινική μέθοδος, είναι η σχέση γλυκόζης προς ινσουλίνη νηστείας. Η μέθοδος όμως αυτή δίνει πληροφορίες για ελάχιστα δευτερόλεπτα στο χρόνο και επομένως μπορεί να αποτύχει στην ανίχνευση όλων των ατόμων με αντίσταση στην ινσουλίνη. Επιπλέον, η σχέση αυτή δεν είναι χρήσιμη όταν η λειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος είναι μειωμένη και έχει ήδη εγκατασταθεί δυσανεξία στη γλυκόζη. Έχει βρεθεί ότι τα μοντέλα εκτίμησης της ομοιόστασης (HOMA και QUICKI), αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για τη διάγνωση της αντίστασης στην ινσουλίνη. Εντούτοις και το μοντέλο αυτό στηρίζεται σε μία μόνο μέτρηση ινσουλίνης και γλυκόζης νηστείας.

Πρόσφατα υποστηρίχθηκε η άποψη ότι η δοκιμασία φόρτισης με γλυκόζη από το στόμα (OGTT) αποτελεί πιο ευαίσθητη μέθοδο, από ό,τι ο λόγος γλυκόζης

νηστείας προς ινσουλίνη νηστείας, στη διάγνωση των διαταραχών ομοιοστασίας της γλυκόζης σε έφηβες με PCOS. Η OGTT ενδέχεται να αποτελεί τη δοκιμασία που παρέχει τις περισσότερες πληροφορίες με τη μικρότερη δυνατή επιβάρυνση της ασθενούς. Πρέπει, πάντως, να σημειωθεί ότι η συχνότητα της αντίστασης στην ινσουλίνη στο PCOS παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις. Τα υψηλότερα ποσοστά ανευρίσκονται όταν χρησιμοποιούνται πιο ευαίσθητες μέθοδοι. Επιπλέον ο έλεγχος για αντίσταση στην ινσουλίνη σε μία γυναίκα με PCOS μπορεί να αποβεί αρνητικός, όταν η γυναίκα είναι νέα και λεπτόσωμη, αλλά να γίνει θετικός με την πάροδο του χρόνου. Η υπερινσουλιναιμία φαίνεται να επιδεινώνεται αυτόματα με την ηλικία στις ενήλικες γυναίκες με PCOS, χωρίς ταυτόχρονη επιδείνωση της υπερανδρογοναιμίας.

Ο υπολογισμός των δεικτών αντίστασης γίνεται ως ακολούθως:

HOMA = 22.5 x 18 / Ινσουλίνη νηστείας x Γλυκόζη νηστείας (275,276)

QUICKI =1 / log (Ινσουλίνη νηστείας) + log (Γλυκόζη νηστείας) (276),

Για το καθορισμό των τιμών της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC, Area under Curve) για τις τιμές γλυκόζης και ινσουλίνης που προκύπτουν από την δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (OGTT) ακολουθείται το μαθηματικό μοντέλο του Tai (277),

Διαταραχή ανοχής γλυκόζης (Impaired Glucose Tolerance, IGT) σημαίνει επίπεδα γλυκόζης μεταξύ 140 και 200 mg/dl δύο ώρες μετά από 75 gr φόρτισης με γλυκόζη (OGTT).

ΣΤ. PCOS, αντίσταση στην ινσουλίνη και επιπλοκές.

1. Αντίσταση στην ινσουλίνη και αύξηση του κινδύνου για σακχαρώδη διαβήτη.

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου για διαταραχή της ανοχής στη γλυκόζη και για ανάπτυξη σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Σε ένα «μοντέλο» της παθογένειας του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι η πρωτοπαθής διαταραχή και ο σακχαρώδης διαβήτης εμφανίζεται εφόσον τα β-κύτταρα του παγκρέατος καθίστανται ανίκανα να ανταπεξέλθουν (278). Οι ασθενείς με PCOS και αντίσταση στην ινσουλίνη διατηρούν φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης με υπερέκκριση ινσουλίνης. Οι ασθενείς αυτές ενδέχεται να έχουν αυξημένο κίνδυνο εξάντλησης των β-κυττάρων και ανάπτυξης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (279).

2. Αντίσταση στην ινσουλίνη και αύξηση του κινδύνου αθηροσκλήρωσης.

Πολύ σημαντικότερο γεγονός από το ποσοστό των γυναικών με PCOS που εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη είναι η διαπίστωση ότι οι γυναίκες αυτές παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης του μεταβολικού συνδρόμου (σύνδρομο Χ). Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από δυσλιπιδαιμία, παχυσαρκία κεντρικού τύπου, υπερπηκτικότητα, διαταραχές της ινωδόλυσης και αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης υπέρτασης, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2

και στεφανιαίας νόσου. Η υπερινσουλιναιμία αυξάνει τους παράγοντες του κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο στο PCOS (280). Έχει βρεθεί ότι οι μεγαλύτερες γυναίκες με PCOS έχουν πιο βαριά αθηροσκλήρωση από τις φυσιολογικές γυναίκες, όπως εκτιμήθηκε από το πάχος του εσωτερικού και του μέσου τοιχώματος της καρωτίδας στο υπερηχογράφημα (281). Οι έφηβες με PCOS και με διαταραχή στην ανοχή της γλυκόζης δεν εμφανίζουν τη νυχτερινή πτώση της αρτηριακής πίεσης (282). Καθώς οι γυναίκες με PCOS φθάνουν την τέταρτη και την πέμπτη δεκαετία, ο κίνδυνος υπέρτασης τριπλασιάζεται και ο κίνδυνος εμφράγματος του μυοκαρδίου επταπλασιάζεται (283). Στην πέμπτη και στην έκτη δεκαετία, οι γυναίκες με ή χωρίς PCOS έχουν παρόμοιο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, αλλά εκείνες με PCOS εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά σακχαρώδη διαβήτη και στεφανιαίας νόσου (284). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι γυναίκες με PCOS παρουσίασαν παράγοντες κινδύνου σε νεώτερη ηλικία, οι οποίοι οδήγησαν σε αυξημένους μακροπρόθεσμους κινδύνους.

Η χρόνια φλεγμονή, προδιαθεσικός παράγοντας κινδύνου για νόσο των στεφανιαίων, είναι συχνότερη σε γυναίκες με PCOS, όπως αποδεικνύεται από τα υψηλά επίπεδα της C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), τα οποία σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την παχυσαρκία, όχι όμως με τα επίπεδα των ανδρογόνων (285). Το PCOS συνοδεύεται επίσης από διαταραχές της ινωδόλυσης (286) και από υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης (287). Υψηλά επίπεδα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (PAI-1), ο οποίος αναστέλλει την ινωδόλυση, βρέθηκαν σε γυναίκες με PCOS και σχετίσθηκαν με τα επίπεδα της ινσουλίνης (288). Η ενδοθηλίνη -1, δείκτης παθολογικής ενδοθηλιακής λειτουργίας βρέθηκε επίσης αυξημένη στο PCOS.

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της αντίστασης στην ινσουλίνη οδήγησε σε ελάττωση των επιπέδων της ενδοθηλίνης -1 (289).

Διαταραχές των λιπιδίων, χαρακτηριστικές του μεταβολικού συνδρόμου, όπως η ελάττωση της HDL-χληστερόλης, τα υψηλά επίπεδα των τριγλυκεριδίων και η αύξηση της LDL-χοληστερόλης, διαπιστώθηκαν επίσης σε γυναίκες με PCOS (290,291,292,293). Η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερινσουλιναιμία, όταν παρατηρούνται ταυτόχρονα με την υπερανδρογοναιμία, φαίνεται ότι είναι οι κύριοι προγνωστικοί δείκτες αυτών των διαταραχών των λιπιδίων, όπως επίσης και των αυξημένων επιπέδων της αθηρογόνου LDL - χοληστερόλης στο PCOS (290,292,293).

3. Η σημασία της αντίστασης στην ινσουλίνη στο PCOS.

Είναι γνωστό ότι όλες οι γυναίκες με αντίσταση στην ινσουλίνη δεν εμφανίζουν PCOS. Οι γυναίκες όμως με PCOS είναι πιθανότερο να προσελκύσουν τη προσοχή των γιατρών. Η ευκαιρία να διαγνωσθεί και να αντιμετωπισθεί η αντίσταση στην ινσουλίνη και ενδεχομένως να ελαττωθεί η μακροπρόθεσμη νοσηρότητα και θνησιμότητα στις γυναίκες αυτές, είναι σημαντική και δεν πρέπει να παραβλέπεται και να εστιάζεται η προσοχή μόνο στα εμφανισιακά προβλήματα και στα προβλήματα γονιμότητας. Μολονότι οι εμφανισιακές εκδηλώσεις λόγω υπερανδρογοναιμίας και η υπογονιμότητα προβληματίζουν τις γυναίκες με PCOS, η αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη και αθηροσκλήρωσης είναι δυνατό να βραχύνουν το προσδόκιμο επιβίωσής τους. Κατά συνέπεια πρέπει να συστήνεται έλεγχος για αντίσταση

στην ινσουλίνη σε κάθε γυναίκα με υπερτρίχωση. Η αντιμετώπιση της αντίστασης στην ινσουλίνη, εφόσον υπάρχει, με μετφορμίνη μπορεί να βελτιώσει τη γονιμότητα, να διευκολύνει την απώλεια βάρους, να ομαλοποιήσει το λιπιδικό προφίλ, να ελαττώσει τη συχνότητα εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη και να προλάβει την αθηροσκλήρωση, το έμφραγμα του μυοκαρδίου και το εγκεφαλικό επεισόδιο (294). Σημειώνεται ότι απαιτούνται μελέτες με προοπτικό σχεδιασμό, μεγάλο αριθμό ατόμων και μεγάλη διάρκεια παρακολούθησης, που θα πιστοποιήσουν τον κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο και εγκεφαλικά επεισόδια και τις ωφέλειες από τη χορήγηση ευαισθητοποιητών της ινσουλίνης (295).

4. Μεταβολισμός και αναπαραγωγή : Σύνδρομο ΧΧ.

Τα τελευταία 25 χρόνια αποσαφηνίσθηκε η άποψη ότι η υπερανδρογοναιμία και η ανωοθυλακιορρηξία αποτελούν χαρακτηριστικά ευρήματα των γυναικών με ποικίλης βαρύτητας αντίσταση στην ινσουλίνη, που κυμαίνεται από τα σύνδρομα της βαριάς αντίστασης, λόγω μεταλλάξεων στον υποδοχέα της ινσουλίνης, έως τον λιποατροφικό διαβήτη και το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (296). Η αυξημένη παραγωγή ανδρογόνων θα μπορούσε επίσης να ανευρίσκεται σε γυναίκες με παχυσαρκία κεντρικού τύπου και αντίσταση στην ινσουλίνη. Η υπερινσουλιναιμία λόγω αντίστασης στην ινσουλίνη, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αύξησης των ανδρογόνων, δεδομένου ότι επιτείνει την παραγωγή τους διαμέσου του υποδοχέα του IGF-I, στα σύνδρομα με μεταλλάξεις του υποδοχέα της

ινσουλίνης, ή διαμέσου του δικού της υποδοχέα στο PCOS (296). Πρόσφατες μελέτες ενισχύουν την άποψη ότι και άλλοι παράγοντες συμμετέχουν στην κατάσταση αυτή. Γενετικές μεταβολές των στοιχείων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στους δρόμους της μετάδοσης του σήματος της ινσουλίνης, όπως είναι ο υποδοχέας της ινσουλίνης και το υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης-2 (IRS-2), προκαλούν αντίσταση στην ινσουλίνη, ανωοθυλακιορρηξία και παχυσαρκία σε ποντίκια (297). Επειδή τα ευρήματα αυτά παρατηρούνται ύστερα από βλάβη του υποδοχέα της ινσουλίνης στον εγκέφαλο, φαίνεται ότι η μετάδοση του σήματος της ινσουλίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος. Πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι όλες οι γυναίκες με αντίσταση στην ινσουλίνη δεν παρουσιάζουν προβλήματα γονιμότητας και όλες οι γυναίκες με προβλήματα γονιμότητας δεν εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη (296). Οι μελέτες σε οικογένειες στηρίζουν τη θέση ότι υπάρχει γενετική προδιάθεση για την υπερανδρογοναιμία και την αντίσταση στην ινσουλίνη στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (296). Συμβατή με την υπόθεση αυτή είναι η ένδειξη για σύνδεση και συσχέτιση ενός γενετικού δείκτη κοντά στον υποδοχέα της ινσουλίνης με το φαινότυπο της υπερανδρογοναιμίας (298). Έτσι εμφανίζονται διαφορές στην ωοθυλακιορρηξία σε προσβεβλημένες αδερφές, με αντίστοιχο βαθμό υπερανδρογοναιμίας και αντίστασης στην ινσουλίνη, εύρημα που αποδεικνύει ότι υπάρχουν και περιβαλλοντικοί ή γενετικοί παράγοντες, οι οποίοι μεταβάλλουν την έκφραση του φαινότυπου (299).

Ο ρόλος των ανδρογόνων στην παθογένεια του PCOS έχει αμφισβητηθεί, επειδή στις ενήλικες τα ανδρογόνα προκαλούν μόνο μέτρια ελάττωση της

ευαισθησίας στην ινσουλίνη (300). Εντούτοις η ενδομήτρια έκθεση θηλέων εμβρύων σε ανδρογόνα ενδέχεται να οδηγήσει στην ενήλικη ζωή σε διαταραχές του αναπαραγωγικού συστήματος και σε διαταραχές του μεταβολισμού, παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Τα ανδρογόνα προκαλούν επίσης αντίσταση στην ινσουλίνη σε θήλεα ποντίκια, η οποία εκδηλώνεται στην ενήλικη ζωή ύστερα από παροδική χορήγηση τεστοστερόνης στη νεογνική ηλικία (301). Τα βιβλιογραφικά δεδομένα στηρίζουν την άποψη ότι τα ανδρογόνα, όταν χορηγηθούν στη φάση της ανάπτυξης, συμμετέχουν στην εμφάνιση φαινότυπου PCOS κατά την ενήλικη ζωή. Η προέλευση των ανδρογόνων κατά την ενδομήτρια ζωή παραμένει άγνωστη, επειδή όλα τα ανδρογόνα της μητέρας αρωματοποιούνται συνήθως στον πλακούντα και δεν οδηγούν σε υπερανδρογοναιμία στο έμβρυο (302). Τα επίπεδα ανδρογόνων του αμνιακού υγρού αυξάνονται στα θήλεα έμβρυα διαβητικών μητέρων, εύρημα συμβατό με την άποψη ότι οι ωοθήκες ή τα επινεφρίδια του εμβρύου μπορούν να παράγουν ανδρογόνα, ακόμη και όταν δεν υπάρχουν κληρονομικές βλάβες στη στεροειδογένεση (303).

Κατά συνέπεια στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών παρατηρούνται διαταραχές του αναπαραγωγικού συστήματος και μεταβολικές διαταραχές. Οι διαταραχές αυτές καθιστούν το PCOS ουσιαστικό πρόβλημα υγείας για τις γυναίκες, με σημαντικές συνέπειες σε όλη τη διάρκεια της ζωής των. Το μεταβολικό σύνδρομο, δηλαδή ο συνδυασμός αντίστασης στην ινσουλίνη, υπέρτασης, δυσλιπιδαιμίας και παχυσαρκίας κεντρικού τύπου, θεωρείται σήμερα σημαντικός παράγοντας κινδύνου για τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και για την καρδιαγγειακή νόσο (304) (Reusch 2002). Δεδομένου ότι οι

διαταραχές του αναπαραγωγικού συστήματος αποτελούν συχνά τμήμα του μεταβολικού συνδρόμου, όταν εμφανίζεται σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, έχει προταθεί πρόσφατα ο συνδυασμός των διαταραχών αυτών να «βαπτισθεί» ως « σύνδρομο ΧΧ » (305).

Ζ. Αδρενεργικοί υποδοχείς.

Ιστορικά, οι αναλύσεις της δομικής δραστικότητας, με σύγκριση της δυναμικής μια σειράς ουσιών αναλόγων του αυτόνομου νευρικού συστήματος, οδήγησε στον ορισμό διαφορετικών υποτύπων υποδοχέων οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν τους μουσκαρινικούς και νικοτινικούς χοληνεργικούς υποδοχείς, τους α, β αδρενεργικούς υποδοχείς και τους ντοπαμινεργικούς αδρενεργικούς υποδοχείς. Η μοριακή βιολογία παράσχει μια νέα προσέγγιση μέσω της ανακάλυψης και έκφρασης γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν υποδοχείς μέσα σε αυτές τις ομάδες. Οι αρχικοί υπότυποι υποδοχέων της ακετυλοχολίνης ονομάστηκαν από τα αλκαλοειδή τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην ταυτοποίηση τους, την μουσκαρίνη και την νικοτίνη. Αυτά τα ονόματα, μετατράπηκαν σε επίθετα και έτσι προέκυψαν οι μουσκαρινικοί και νικοτινικοί υποδοχείς. Ο όρος αδρενεργικοί υποδοχείς χρησιμοποιείται ευρέως, ώστε να περιγράψει υποδοχείς οι οποίοι ενεργοποιούνται από τις κατεχολαμίνες και την νοραδρεναλίνη. Αναλόγως, ο όρος χοληνεργικοί υποδοχείς υποδεικνύει υποδοχείς (μουσκαρινικούς και νικοτινικούς) οι οποίοι ενεργοποιούνται από την ακετυλοχολίνη. Οι αδρενεργικοί υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που συνδέονται με G- πρωτεΐνες (307). Συγκεκριμένα για τους υποδοχείς αυτούς η ενίσχυση και η μετάδοση του σήματος μέσα στο κύτταρο

περιλαμβάνει μια ετεροτριμερή πρωτεΐνη που συνδέεται με το γουανινο-τριφωσφορο νουκλεοτίδιο (308). Όλοι οι υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτείνες, περιλαμβανομένων των αδρενεργικών, παρουσιάζουν κάποια κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα οι υποδοχείς αυτοί έχουν επτά υδρόφοβες, διαμεμβρανικές περιοχές. Το αμινοτελικό άκρο των υποδοχέων αυτών βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται ενδοκυττάρια. Στην αμινοτελική περιοχή τους συνήθως υπάρχει μία ή περισσότερες θέσεις γλυκοσυλίωσης σε κατάλοιπα ασπαραγίνης. Οι κυτταροπλασματικές περιοχές συχνά περιέχουν θέσεις φωσφορυλίωσης από μία ή περισσότερες θέσεις γλυκοσυλίωσης από μία ή περισσότερες κυτταροπλασματικές κινάσες. Οι αδρενεργικοί υποδοχείς μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω σε α και β αδρενεργικούς υποδοχείς στην βάση της αγωνιστικής και ανταγωνιστικής τους δράσης. Οι α_1 αδρενεργικοί υποδοχείς βρίσκονται κυρίως στα αγγεία και η ενεργοποίηση τους προκαλεί διέγερση με συστολή των λείων μυϊκών ινών των αγγείων, του πεπτικού σωλήνα και του διαστολέα της ίριδας. Οι α_2 αδρενεργικοί υποδοχείς επάγουν μια ποικιλία φυσιολογικών αποκρίσεων στο κύτταρο από τις οποίες η κυριότερη είναι η αναστολή της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (309) και η αναστολή της νευρικής εκφόρτισης μέσω ρύθμισης καναλιών ιόντων. Στους περιφερικούς ιστούς, οι α_2- αδρενεργικοί υποδοχείς αναστέλλουν την απελευθέρωση νοραδρεναλίνης από τους συμπαθητικούς νευρώνες και την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης από τους παρασυμπαθητικούς νευρώνες. Οι β_2 αδρενεργικοί υποδοχείς προκαλούν χάλαση στις λείες μυϊκές ίνες. Σημαντικότεροι είναι οι β_2 υποδοχείς των λείων μυϊκών ινών του βρογχικού δένδρου. Βρίσκονται στα αγγεία των σκελετικών

μυών τα οποία έχουν και β_1 υποδοχείς. Επίσης οι β_2 υποδοχείς βρίσκονται σε μερικούς αδένες, ο σπουδαιότερος είναι το παγκρέας, όπου προκαλούν αύξηση της έκκρισης ινσουλίνης. Έχουν επίσης σπουδαίο μεταβολικό ρόλο στο ήπαρ, στους σκελετικούς μύες και το λιπώδη ιστό όπου διεγείρουν την γλυκονεογένεση, τη γλυκογονόλυση και την λιπόλυση. Οι β_3 αδρενεργικοί υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως στον λιπώδη ιστό και διεγείρουν την λιπόλυση και αυξάνουν την θερμογένεση στους σκελετικούς μύες (310).

Οι α αδρενεργικοί υποδοχείς στη συνέχεια διαχωρίζονται περαιτέρω σε δύο τύπους α_1 και α_2 σύμφωνα με την ιστολογική τους κατανομή στον οργανισμό (311). Φαρμακολογικά ο διαχωρισμός αυτός βασίστηκε στην σειρά ισχύος δύο αγωνιστών, της υοχιμβίνης και της πραζοσίνης (312). Περαιτέρω οι α_2 αδρενεργικοί υποδοχείς έχουν διακριθεί σε τρείς υποτύπους α_{2A}, α_{2B}, α_{2C} (313). Και οι τρείς αυτοί υπότυποι του α_2 αδρενεργικού υποδοχέα έχουν υψηλή συγγένεια για τις κατεχολαμίνες, ενώ για την οξυμεταζολίνη μόνον ο α_{2A} έχει υψηλή συγγένεια. Τέλος για την πραζοσίνη υψηλή συγγένεια παρουσιάζουν τόσο ο α_{2B} όσο και ο α_{2C} αδρενεργικός υποδοχέας. Τρία διαφορετικά γονίδια κωδικοποιούν τους ανθρώπινους α_2 αδρενεργικούς υποτύπους. Τα γονίδια αυτά έχουν κλωνοποιηθεί και συμβολίζονται ως α_2C10, α_2C4 και α_2C2 σύμφωνα με τις θέσεις των γονιδίων αυτών πάνω στα χρωμοσώματα (314). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά αποτελούν τους φαρμακολογικούς αδρενεργικούς υποτύπους (το γονίδιο α_2C10 κωδικοποιεί τον α_{2A} υπότυπο, το γονίδιο α_2C4 κωδικοποιεί τον α_{2C} υπότυπο, ενώ το γονίδιο α_2C2 κωδικοποιεί τον α_{2B} υπότυπο (313,314). Τα γονίδια των α_2 αδρενεργικών υποδοχέων δεν έχουν ιντρόνια. Στον άνθρωπο ο α_{2A} αδρενεργικός υποδοχέας εντοπίζεται σε πολλά περιφερικά όργανα

καθώς και στον εγκέφαλο, αντιπροσωπεύοντας στην θέση αυτή τον κύριο α_2 αδρενεργικό υπότυπο. Ο α_{2C} αδρενεργικός υποδοχέας εκφράζεται στον εγκέφαλο και στο ήπαρ, ενώ τέλος ο α_{2B} αδρενεργικός υποδοχέας εκφράζεται στα νεφρά (και συγκεκριμένα στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο), στους λείους μύες των περIφερικών αγγείων καθώς και στον εγκέφαλο (Goodman & Gilman's, 1996).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. Σκοπός της μελέτης

Είναι γνωστό ότι το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών είναι η πιο συχνή ενδοκρινοπάθεια σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας προσβάλλοντας το 6-10% του γενικού πληθυσμού. Το PCOS χαρακτηρίζεται από υπερτρίχωση, ανωοθηλακιορρηξία και υπερανδρογοναιμία και σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την παχυσαρκία. Η αντίσταση στην ινσουλίνη κατέχει ένα σημαντικό ρόλο τόσο ως αίτιο αλλά και ως αποτέλεσμα του συνδρόμου. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης αφορά την ανίχνευση τυχόν συσχετίσεων μεταξύ γενετικών πολυμορφισμών των γονιδίων των α_{2B} και β_3 αδρενεργικών υποδοχέων, του γονιδίου του υποδοχέα της ινσουλίνης ,του PPARγ_2 γονιδίου και του γονιδίου HSD17B5 με κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών όπως η υπερανδρογοναιμία, ο βασικός μεταβολισμός και η αντίσταση στην ινσουλίνη σε Ελληνίδες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών.

Τα γονίδια των α_{2B} και β_3 αδρενεργικών υποδοχέων επιλέχθηκαν δεδομένου ότι έχουν συσχετισθεί με την παχυσαρκία η οποία σχετίζεται με το PCOS. Το PPARγ_2 επιλέχθηκε δεδομένου του ρόλου του στην λιπογένεση και στην μεταβίβαση του ενδοκυτταρίου σήματος της ινσουλινης. Το γονίδιο HSD17B5 επιλέχθηκε δεδομένου ότι κωδικοποιεί ένα ένζυμο που έχει σημαντικό ρόλο στην ωοθηκική στεροειδογένεση και στην επακόλουθη υπερανδρογοναιμία η οποία αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό του PCOS.

Β. Ασθενείς και Μέθοδοι.

1. Πληθυσμός Μελέτης.

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν 156 PCOS Ελληνίδες με μέση ηλικία 22.64±0.44, μέσο BMI 25.73±0.64 και 56 γυναίκες της ομάδας ελέγχου με μέση ηλικία 22.91±1.5, BMI 21.19±2.5 και φυσιολογική έμμηνο ρύση.Η διάγνωση του PCOS βασίσθηκε στην ταυτόχρονη παρουσία βιοχημικής υπερανδρογοναιμίας, χρόνια ανωοθηλακιορρηξίας και πολυκυστικής μορφολογίας των ωοθηκών. Η ομάδα ελέγχου είχε φυσιολογικούς ωορρηκτικούς κύκλους και προγεστερόνη >10ng/ml στην ωχρινική φάση του κύκλου και κανένα σημείο κλινικής υπερανδρογοναιμίας. Κριτήρια αποκλεισμού των γυναικών με PCOS ήταν η συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων (ΣΥΕ), όγκοι που εκκρίνουν ανδρογόνα και το σύνδρομο Cushing.

2. Μέθοδοι μέτρησης κλινικών χαρακτηριστικών.

Η σύσταση του σώματος καθορίστηκε από βιοηλεκτρική αντίσταση (impedance) (Body Composition Analyzer, Tanita, Tokyo Japan). Ο βασικός μεταβολικός ρυθμός (BMR) μετρήθηκε με την μέθοδο της έμμεσης θερμιδομετρίας (Pulmolab EX505, Morgan Medical Ltd, Kent, U.K.) όπως περιγράφεται από τον Ferrannini (315) και εκφράζεται ως Kcal/day. Το BMR κάθε ατόμου τροποποιήθηκε για την ελευθέρα λίπους μάζα, την μάζα του λίπους, το φύλο και την ηλικία, όπως είχε περιγραφεί προηγουμένως (316), χρησιμοποιώντας την εξίσωση: τροποποιημένο BMR= (μέσος όρος του BMR)

+ (μετρημένο BMR – προβλεπόμενο BMR). Για κάθε άτομο, το προβλεπόμενο BMR υπολογίσθηκε αντικαθιστώντας την ατομική καθαρή σωματική μάζα, την μάζα του λίπους, το φύλο και την ηλικία στην ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression) από τα συνολικά δεδομένα.Οι σωματικές μετρήσεις περιελάμβαναν το βάρος, το ύψος, την ελευθέρα του λίπους μάζα, την μάζα του λίπους, την συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση και την καρδιακή συχνότητα σε ηρεμία. Οι βιοχημικές παράμετροι περιελάμβαναν την τεστοστερόνη του ορού, την ελεύθερη τεστοστερόνη (Free testosterone), την ανδροστενεδιόνη, την ολική χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, την HDL και την LDL χοληστερόλη και τα επίπεδα γλυκόζης. Επίσης διενεργήθηκε δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (OGTT) με χορήγηση 75 γραμμαρίων γλυκόζης. Η αντίσταση στην ινσουλίνη εκτιμήθηκε από τα επίπεδα της ινσουλίνης νηστείας, της γλυκόζης νηστείας, τον λόγο γλυκόζη νηστείας/ινσουλίνη νηστείας τον δείκτη HOMA και τον δείκτη QUICKI, όπως επίσης και την περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) από τις τιμές γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης (OGTT). Όλες οι μετρήσεις των ορμονών πραγματοποιήθηκαν με ποσοτικοποιημένη ηλεκτροχημειοφωταύγεια (electrochemiluminescence) (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Laval, Quebec) με την εξαίρεση της ανδροστενεδιόνης του ορού και της 17-υδροξυπρογεστερόνης οι οποίες μετρήθηκαν με RIA χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια (Kits) (BioSource, B-1400 Nivelles-Belgium). Η μελέτη μας ήταν σύμφωνη με τις αρχές της συμφωνίας του Helsinki και όλα τα άτομα έδωσαν την συγκατάθεση τους.

3. Μοριακές Μέθοδοι.

α. Αναζήτηση και ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μέσω χρήσης λογισμικών προγραμμάτων.

Για την αναζήτηση και ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων CFH και LOC387715 χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι λογισμικά προγράμματα:

NCBI-GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) **:** Πρόκειται για μια ψηφιακή βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών (NIH-National Institute of Health) στην οποία βρίσκονται καταχωρημένες όλες τις διαθέσιμες DNA αλληλουχίες (Benson DA et al; 2008). Η GenBank αποτελεί μέρος της Διεθνούς Συνεργασίας Βάσεων Δεδομένων Νουκλεοτιδικών Αλληλουχιών (International Nucleotide Sequence Database Collaboration), που περιλαμβάνει επιπροσθέτως την Ιαπωνική DNA DataBank (DDBJ) και την EMBL. Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων προσφέρει επίσης την δυνατότητα ανάλυσης της ταυτοσημίας μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με ομόλογες αλληλουχίες μέσω της εφαρμογής NCBI-BLASTn αλλά και την δυνατότητα αναζήτησης πολυμορφισμών σε μια δεδομένη αλληλουχία DNA μέσω της εφαρμογής NCBI-BLAST SNP.

EMBL-Ensembl (www.ensembl.org) **:** Η βάση δεδομένων Ensembl συνιστά ένα κοινό σχέδιο του Ευρωπαϊκού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής (EMBL – EBI) και του Ινστιτούτου Sanger με σκοπό την ανάπτυξη ενός λογισμικού

συστήματος παραγωγής και διατήρησης γονιδιωματικών αλληλουχιών ευκαρυωτικών οργανισμών.

NEBcutter2: Διαδικτυακό Λογισμικό πρόγραμμα κατασκευής χαρτών περιορισμού αλληλουχιών DNA της εταιρίας Biolabs. Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση θέσεων περιορισμού στα υπό μελέτη γονίδια.

Σχεδιασμός εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων

Για τον σχεδιασμό των ειδικών εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι λογισμικά προγράμματα:

PcGene: Πρόγραμμα λογισμικού για τον σχεδιασμό ζευγών εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων.

Primer3 & IDT-Oligo analyzer 3.1: Προγράμματα λογισμικού για τον σχεδιασμό ζευγών εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων και για τον έλεγχο των επιμέρους ιδιοτήτων αυτών (ελεύθερη ενέργεια, σχηματισμός διμερών). Είναι διαθέσιμα στις διευθύνσεις: (http://frodo.wi.mit.edu/ και www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer, αντίστοιχα.

β. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό ανθρώπινο αίμα.

Απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από λευκοκύτταρα ολικού ανθρώπινου αίματος των ασθενών και μαρτύρων. Στην μέθοδο αυτή, αρχικά γίνεται επιλεκτική λύση των κυτταροπλασματικών μεμβρανών των ερυθρών και λευκών κυττάρων και λαμβάνονται οι πυρήνες των λευκών αιμοσφαιρίων. Ακολουθεί λύση της πυρηνικής μεμβράνης με απορρυπαντικά, με αποτέλεσμα

την απελευθέρωση του γονιδιωματικού DNA στο διάλυμα και επώαση του διαλύματος με διάλυμα πρωτεϊνάσης για τον καθαρισμό του DNA από τις ιστόνες. Στην συνέχεια, απομακρύνονται με τη χρήση οργανικών διαλυτών τα υπολείμματα κυττάρων, τα θραύσματα των μεμβρανών και οι πρωτεΐνες. Τέλος, το DNA λαμβάνεται σε καθαρή μορφή μέσω κατακρήμνισης με αιθανόλη και επαναδιάλυσης σε ρυθμιστικό διάλυμα ή ddH_2O.

Υλικά

- 100% v/v αιθανόλη
- 70% v/v αιθανόλη
- 10% w/v SDS
- Διάλυμα φαινόλης (25):χλωροφορμίου(24): ισοαμυλικής αλκοόλης(1) (Invitrogen, Cat.No. 15593-049)
- Λυτικό διάλυμα
- Proteinase K (10mg/ml) (Invitrogen, Cat.No. 25530-015)
- CH_3COONa 3M

Όργανα

- Φυγόκεντρος Jouan – swing out rotor
- Υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 37 ^oC.

Πειραματική πορεία

1. Λήψη 5 ml ολικού αίματος σε σωληνάριο προπυλενίου με αντιπηκτικό (ηπαρίνη). Το αίμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία -80 ^oC.
2. Απόψυξη των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανακίνηση ανά τακτά χρονικά διαστήματα.
3. Προσθήκη 11 ml ddH_2O (Vτελ=14 ml).

4. Ανακίνηση δια αναστροφής για 10 min.
5. Φυγοκέντρηση στις 2.500 rpm για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου (19 ^{o}C-25 ^{o}C).
6. Απόχυση του υπερκειμένου δια αναστροφής και λήψη του ιζήματος.
7. Επανάληψη των βημάτων 3-5. (Έκπλυση του ιζήματος)
8. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 1,5-2 ml λυτικού διαλύματος.
9. Προσθήκη 200μl 10% w/v SDS και 20 μl διαλύματος proteinase K.
10. Ανάδευση δια αναστροφής και επώαση σε υδατόλουτρο 37 ^{o}C o/n (16h).
11. Προσθήκη ενός όγκου μείγματος φαινόλης (25):χλωροφορμίου(24): ισοαμυλικής αλκοόλης(1) για κάθε όγκο διαλύματος.
12. Προσθήκη οξικού νατρίου σε τελική συγκέντρωση 0,3 M.
13. Ήπια ανακίνηση δια αναστροφής για 10 min.
14. Φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Λήψη της υπερκείμενης υδατικής φάσης και μεταφορά σε καθαρό σωληνάριο προπυλενίου των 15 ml.
16. Επανάληψη των βημάτων 11-14 εφόσον το δείγμα είναι πολύ πυκνό.

Κατακρήμνιση του γονιδιωματικού DNA με αιθανόλη

17. Προσθήκη διπλάσιου όγκου απόλυτης ψυχρής αιθανόλης για κάθε όγκο υδατικής φάσης.
18. Συλλογή του DNA (άσπρη κλωστή) με γυάλινη πιπέτα Pasteur.
19. Έκπλυση σε 70% w/v αιθανόλη.
20. Διάλυση σε 0,5-1 ml ddH_2O ή ρυθμιστικό διάλυμα TE pH 8.0.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Μέθοδος

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό, το

χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η βασική αρχή της μεθόδου είναι ότι εφόσον τα μόρια DNA τοποθετηθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, λόγω του αρνητικού φορτίου του φωσφορικού σκελετού θα μετακινηθούν προς το θετικό πόλο. Τα δίκλωνα γραμμικά τμήματα DNA κινούνται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης με ρυθμό ο οποίος είναι αντιστρόφως ανάλογος του δεκαδικού λογάριθμου (log_{10}) του μοριακού τους βάρους ή του αριθμού των βάσεών τους. Συνεπώς, ο διαχωρισμός των μορίων DNA γίνεται με βάση το μέγεθός τους.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μορίων DNA σε ένα πήκτωμα αγαρόζης περιγράφεται από την εξίσωση: $log\mu = log\mu_0 - K_r\tau$, όπου μ_0 η ελεύθερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA και K_r ο συντελεστής καθυστέρησης (retardation coefficient), μια σταθερά που σχετίζεται με τις ιδιότητες του πηκτώματος, το μέγεθος και το σχήμα των προς ανάλυση μορίων. Συνεπώς, επηρεάζεται από την συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, την στερεοδιαμόρφωση του DNA και την εφαρμοζόμενη τάση.

Υλικά

- 0,5X TBE (Tris-borate-EDTA).
- 10X διάλυμα χρωστικής bromophenol blue
- βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml πηκτώματος.

Όργανα

- Οριζόντια ηλεκτροφορητική συσκευή
- Τροφοδοτικό ρεύματος εργαστηρίου
- Επιτραπέζια λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας
- Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (EDAS 120).

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

1. Διάλυση της κατάλληλης ποσότητα αγαρόζης σε διάλυμα 0,5X TBE με βρασμό.
   - Ο όγκος του διαλύματος υπολογίζεται σύμφωνα με τις διαστάσεις της μήτρας που θα χρησιμοποιηθεί για την στερεοποίηση του πηκτώματος (Όγκος = πλάτος χ μήκος χ ύψος μήτρας).
   - Το ποσό της αγαρόζης που προστίθεται υπολογίζεται με βάση την επιθυμητή τελική συγκέντρωση αγαρόζης του πηκτώματος.
2. Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε αναλογία 5 μl/100 ml πηκτώματος, λίγο πριν η θερμοκρασία του διαλύματος φτάσει στο σημείο πήξης (~ 37-40 ^{o}C).
3. Η στερεοποίηση του πηκτώματος γίνεται σε διάφανη (στην UV ακτινοβολία) πλαστική επιφάνεια συγκεκριμένων διαστάσεων, τη μήτρα. Οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων DNA σχηματίζονται με τη βοήθεια ειδικών “χτενών” που τοποθετούνται στη συσκευή πριν από την πήξη του πηκτώματος.
4. Στερεοποίηση του πηκτώματος σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Φύλαξη σε σκοτεινό μέρος αφού το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φωτοευαίσθητο.

Πορεία ηλεκτροφόρησης

1. Στα δείγματα DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται 10 X διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης σε αναλογία 1 μl χρωστικής/ 10 μl δείγματος DNA.

2. Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορείται μάρτυρας DNA γνωστών μοριακών μεγεθών και συγκέντρωσης (DNA λ φάγου-Παράρτημα ΙΙ), προκειμένου να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA που αναλύονται.
3. Τα δείγματα DNA και το δείγμα του μάρτυρα τοποθετούνται σε ειδικές θέσεις του πηκτώματος με τη βοήθεια μικροπιπέττας. Η μέγιστη χωρητικότητα των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων είναι 30 μl.
4. Η ανάλυση των δειγμάτων γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό σταθερή ένταση ρεύματος 100-120 Volt σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5X TBE.
5. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτογραφίζεται σε σύστημα: Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (EDAS 120).

Μέθοδοι εύρεσης των γονοτύπων ασθενών και μαρτύρων

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Συμβατική PCR)

Η τεχνική PCR είναι μια *in vitro* ενζυμική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που έχουν σαν βάση τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό μιας ειδικής αλληλουχίας DNA. Η αναγνώριση των ειδικά πολλαπλασιασμένων αλληλουχιών γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, όπου το DNA εμφανίζεται σε μια ζώνη. Σε μια αντίδραση ένα μείγμα DNA αναμειγνύεται με τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), δυο εναρκτήρια ολιγινουκλεοτίδια ή εκκινητές (primers) και την ειδική DNA πολυμεράση. Το δείγμα θερμαίνεται στους 94-95 ^{o}C για να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA και ακολούθως ψύχεται στην κατάλληλη θερμοκρασία για να υβριδοποιηθούν τα εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72 ^{o}C και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές έως ότου συντεθεί αρκετό προϊόν (

ο συνήθης αριθμός κύκλων είναι 30). Η αντίδραση είναι εκθετική αφού σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται.

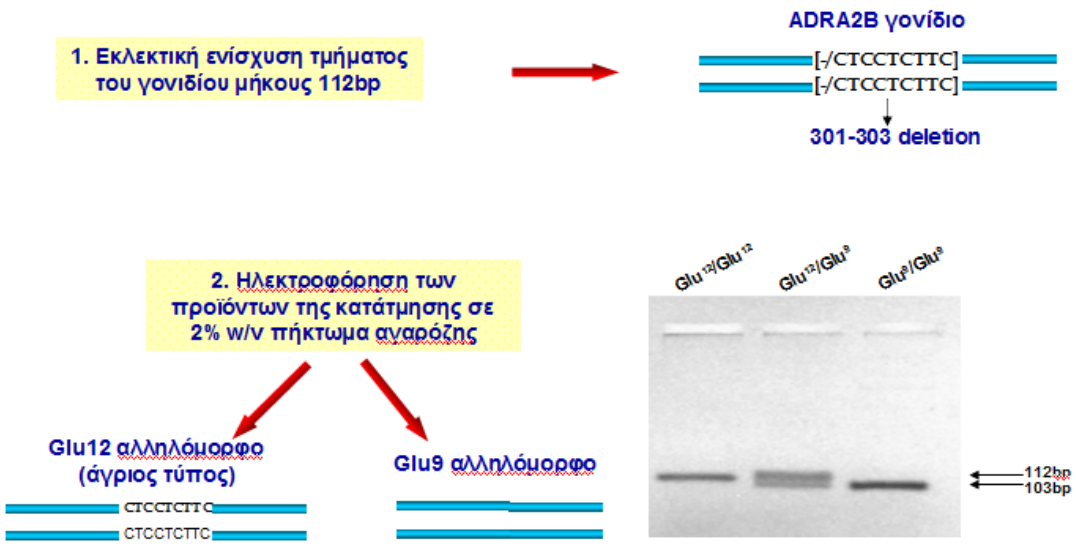
γ. Γονίδιο του αδρενεργικού υποδοχέα α_{2B}.

Γονότυπος

Το DNA του γονιδιώματος εξήχθη από τα περιφερικά λευκοκύτταρα του αίματος των ασθενών μέσω ενός εμπορικού kit (Nucleospin Blood QuickPure, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Ένα τμήμα από το γονίδιο του α_{2B} το οποίο περιείχε την πολυμορφική επανάληψη του γλουταμικού ενισχύθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) όπως είχε περιγραφεί προηγουμένως (317) **(Εικόνα 6).**

Τα ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές 5΄AGGGTGTTTGTGGGGCATCTCC3΄ και 5΄CAAGCTGAGGCCGGAGACACT3΄ συνετέθησαν από την MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany. Ένα τμήμα του γονιδίου του β_3 αδρενεργικού υποδοχέα το οποίο περιείχε την πολυμορφική γλουταμική επανάληψη ενισχύθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) όπως είχε περιγραφεί προηγουμένως (317). Τα ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές 5΄CCAATACCGCCAACACCAGT3΄ και 5΄AAGGAGTCCCATCACCAGGTC3΄ συνετέθησαν από την MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany. 100 ng γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιήθηκε ως template σε ένα PTC-200 thermocycler (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA). Η PCR πραγματοποιήθηκε σε ένα συνολικό όγκο 50μl, χρησιμοποιώντας 10 pmol από κάθε εκκινητή, 200μM από κάθε dNTP, 1.5 mM MgCl, 2.5 U Gibco Brl Taq DNA polymerase (ANTI-SEL, Thessaloniki, Greece) και 10x reaction

buffer το οποίο περιείχε 200 mM Tris-HCl (pH=8.4) and 500 mM KCl. Οι συνθήκες PCR ήταν : denaturation at 95°C, annealing at 55°C and extension at 72°C, ακολουθούμενη από ένα τελικό extension για 10 λεπτά στους 720C. Όσον αφορά τα αλληλόμορφα του β_3, όλα τα παράγωγα της PCR κατατμήθηκαν από το ένζυμο BstN 1 (12-18 ώρες επώαση στους 60^0C σε διάλυμμα επώασης του κατασκευαστή).



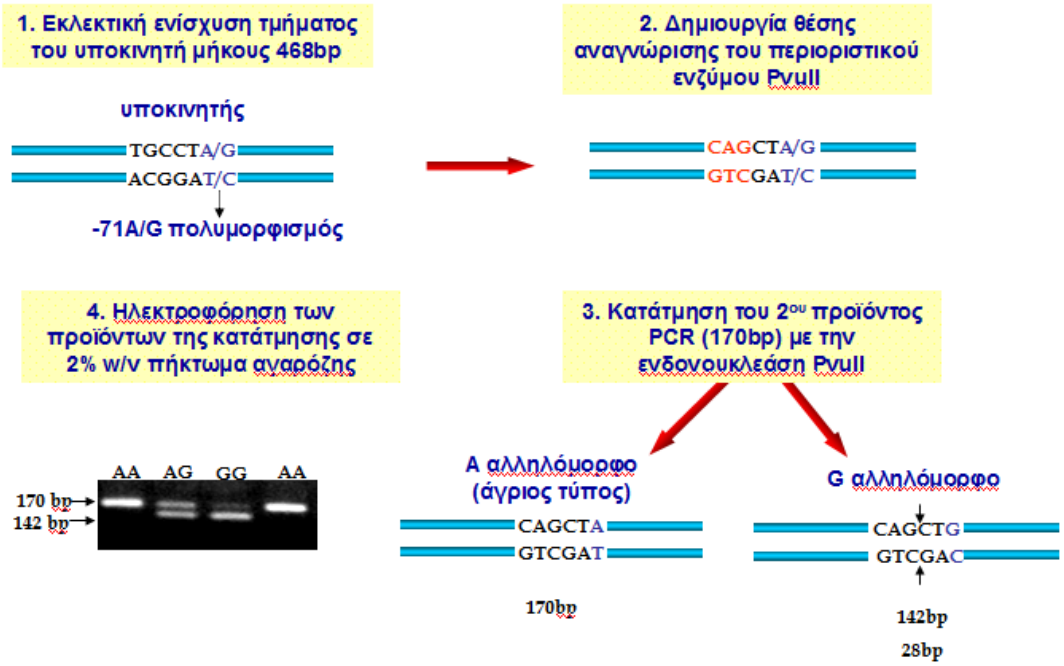
Εικόνα 6 : Μέθοδος γονοτυπικής ανάλυσης του αδρενεργικού υποδοχέα α_{2B}.

δ. Γονίδιο του HSD17B5

Γονότυπος

Το DNA του γονιδιώματος εξήχθη από το ολικό περιφερικό αίμα με την μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου. Σε όλα τα δείγματα του DNA έγινε γονότυπος με PCR δύο βημάτων με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση ώστε να δημιουργηθεί μια θέση περιορισμού όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως

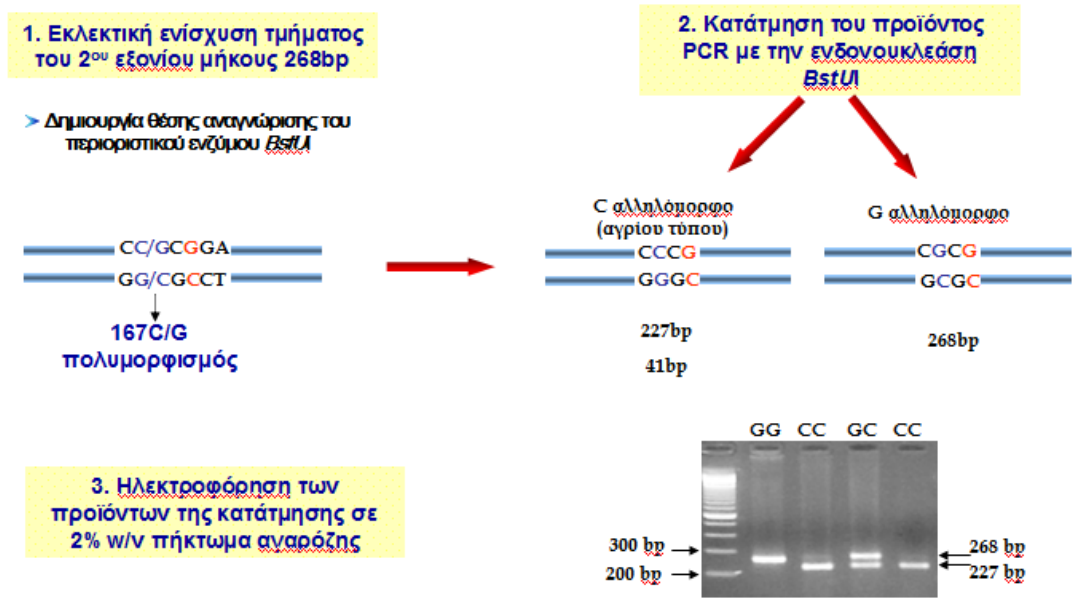
(318) **(Εικόνα 7).** Οι εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων συντέθηκαν από VBC-Genomics Bioscience Research GmbH, Wien.



Εικόνα 7 : Μέθοδος γονοτυπικής ανάλυσης του 17βHSD.

ε. Γονίδιο του PPARγ

Το DNA του γονιδιώματος εξήχθη από το ολικό περιφερικό αίμα μέσω της μεθόδου φαινόλης/χλωροφορμίου. Σε όλα τα δείγματα DNA προσδιορίστηκε ο γονότυπος μέσω PCR-RLFP (restriction fragment length polymorphism) όπως προηγουμένως έχει περιγραφεί: BstU-I πολυμορφισμός για Pro12Ala PPARγ2 (319) και MvaI πολυμορφισμός για Gly972Arg IRS-1 (320), **(Εικόνα 8).** Οι εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων συντέθηκαν από VBC-Genomics Bioscience Research GmbH, Wien.



Εικόνα 8 : Μέθοδος γονοτυπικής ανάλυσης του PPARγ .

4. Στατιστική ανάλυση.

Η κατανομή των γονοτυπικών συχνοτήτων ελέγχθηκε με την εξίσωση Hardy-Weinberg και συγκρίθηκε με τις γονοτυπικές συχνότητες σε μια ομάδα φυσιολογικών ατόμων με τον έλεγχο χ^2 test. Το Independent samples t-test με το two-tailed test στατιστικής σημαντικότητας και το Levene's test for Equality of Variances χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθεί η δύναμη αυτών των σχέσεων. Συσχετίσεις με στατιστικά σημαντική τιμή του $p<0.05$ θεωρήθηκαν σημαντικές. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα SPSS 15.0 για Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Γ. Αποτελέσματα.

1. Γονίδιο του αδρενεργικού υποδοχέα α_{2B} και β_3.

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων των α_{2B} και β_3 γονοτύπων στους PCOS ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου δεν ήταν διαφορετικές από ότι προβλεπόταν από την υπόθεση του Hardy-Weinberg ($p>0.10$). Οι συχνότητες των γονοτύπων στην ομάδα ελέγχου εμφανίζονται στον Πίνακα 1. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου ($p=0.39$). Η συχνότητα των γονιδίων ήταν 70 (81%) για το Glu^{12} και 24 (19%) για το Glu^{9} στην ομάδα ελέγχου και 146 (80.00%) για το Glu^{12} και 36 (20%) για το Glu^{9} συ γυναίκες με PCOS. Οι συχνότητες των β_3 γονοτύπων σε γυναίκες με PCOS ήταν 93% (53) για τους ομοζυγώτες για το φυσιολογικό αλληλόμορφο και 7% (4) για τους ετεροζυγώτες. Το μεταλλαχθέν αλληλόμορφο δεν βρέθηκε σε ομοζυγωτία. Ως συνέπεια, η συχνότητα των αλληλομόρφων ήταν όπως προηγουμένως είχε περιγραφεί και επομένως οι διαφορετικοί γονότυποι του β_3 δεν χρησιμοποιήθηκαν για συγκριτική ανάλυση εξαιτίας της χαμηλής επίπτωσης του μεταλλαχθέντος αλληλομόρφου. Το τροποποιημένο BMR των 63 ασθενών συγκρίθηκε στους γονοτύπους του υποδοχέα α_{2B}. Το τροποποιημένο BMR ήταν 1493.7±104.5 (n=41) Cal/ημέρα για τους ομόζυγους Glu^{12}/ Glu^{12} και 1527.7±140.6 Cal/ημέρα για τους ετερόζυγους ($p=0.85$) (Πίνακας 2). Η ανάλυση MANOVA έδειξε ότι οι πολυμορφισμοί των α_{2B} και β_3 δεν συσχετίσθηκαν με το BMI των ασθενών και την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Πίνακας 1. *Κατανομή συχνοτήτων των γονοτύπων του αδρενεργικού υποδοχέα α_{2B} στις γυναίκες με PCOS και στην ομάδα ελέγχου.*

	Glu12/Glu12		Glu12/Glu9		Glu9/Glu9		Σύνολο	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ομάδα ελέγχου	26	56	18	38	3	6	47	100
PCOS	57	63	32	35	2	2	91	100

Πίνακας 2. *Φυσικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των γυναικών με PCOS αναλόγως του γονοτύπου του πολυμορφισμού του γονιδίου του αδρενεργικού υποδοχέα α_{2B}.*

Τα δεδομένα εμφανίζονται με το μέσο όρο ± standard error of the mean.

Χαρακτηριστικά	Γονότυπος			p τιμή (ANOVA)
	Total (n=89)	Glu12/Glu12 (n=57)	Glu12/Glu9 (n=32)	
Ηλικία(έτη)	24 ± 0.6 (n=81)	24 ± 0.6 (n=53)	25 ± 1.3 (n=28)	0.48
Βάρος (kg)	72.5 ± 2 (n=76)	71.8 ± 2.6 (n=48)	73.6 ± 3.5 (n=28)	0.68
Ύψος (cm)	164 ± 1 (n=65)	163 ± 1 (n=41)	165 ± 1 (n=24)	0.18
BMI (kg/m2)	27.41 ± 0.83 (n=65)	27.41 ± 1.02 (n=41)	27.42 ± 1.43 (n=24)	1.0

Τροποποιημένο BMR (Cal/day)	**1505.6 ± 83.2 (n=63)**	**1493.7 ± 104.5 (n=41)**	**1527.7 ± 140.6 (n=22)**	**0.85**
Γλυκόζη νηστείας (mg/dL)	**83.4 ± 1.4 (n=72)**	**82.2 ± 1.2 (n=49)**	**85.9 ± 3.4 (n=23)**	**0.31**
Ινσουλίνη νηστείας (μU/mL)	**13.6 ± 1.3 (n=72)**	**14.2 ± 1.8 (n=48)**	**12.3 ± 1.7 (n=24)**	**0.51**
HOMA	**66.94 ± 8.66 (n=72)**	**64.55 ± 9.12 (n=48)**	**71.70 ± 18.81 (n=24)**	**0.70**
QUICKI	**0.347 ± 0.005 (n=72)**	**0.346 ± 0.006 (n=48)**	**0.348 ± 0.010 (n=24)**	**0.86**
AUC	**13896 ± 402 (n=71)**	**13414 ± 482 (n=47)**	**14838 ± 697 (n=24)**	**0.09**
Γλυκόζη/Ινσουλίνη	**10.24 ± 1.06 (n=72)**	**9.98 ± 1.14 (n=48)**	**10.76 ± 2.26 (n=24)**	**0.73**

2. Γονίδιο του HSD17B5.

Οι συχνότητες των πολυμορφισμών των γονοτύπων της 17β-υδροξυστεροειδικής δευδρογενάσης τύπου V (HSD 17B5) (-71A/G SNP)

εμφανίζονται στον Πίνακα 3. Καμία συσχέτιση του -71A/G SNP δεν ανιχνεύθηκε.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά της ομάδας μελέτης εμφανίζονται στον Πίνακα 4. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των ομάδων γονοτύπων του AA και του AG, καθώς η ομάδα GG ήταν πολύ μικρή ώστε να έχει στατιστική δύναμη. Επομένως οι τιμές του p οι οποίες αναφέρονται σε συσχετίσεις μεταξύ του HSD-AA και HSD-AG τύπων μόνο.

Ο σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός στην θέση -71A/G του υποκινητή του γονιδίου συσχετίσθηκε με αυξημένα επίπεδα τεστοστερόνης (p=0.031) και με ελαττωμένο λόγο Ανδροστενεδιόνης/Τεστοστερόνη (p=0.018) σε σύγκριση με τον γονότυπο του υποκινητή-71AA. Αναφορικά με τον γονότυπο -71GG καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε εξαιτίας του μικρού αριθμού των ασθενών, παρόλα αυτά μια καθαρή τάση για υψηλότερα επίπεδα Τεστοστερόνης και ακόμη χαμηλότερο λόγο Ανδροστενεδιόνης/Τεστοστερόνη εμφανίσθηκε.

<u>Πίνακας 3</u>. *Συχνότητες γονοτύπων της 17β- υδροξυστεροειδικής δευδρογενάσης τύπου V (HSD 17B5) σε γυναίκες με PCOS και βιοχημική υπερανδρογοναιμία και στην ομάδα ελέγχου γυναικών με φυσιολογική έμμηνο ρύση.*

Συχνότητες Γονοτύπων	**PCOS (%)**	**CONTROLS (%)**	**p**
AA	**63,28% n=95**	**62,7% n=32**	**ns**
AG	**30,47% n=45**	**35,3% n=8**	**ns**
GG	**6,25% n=10**	**2% n=1**	**ns**

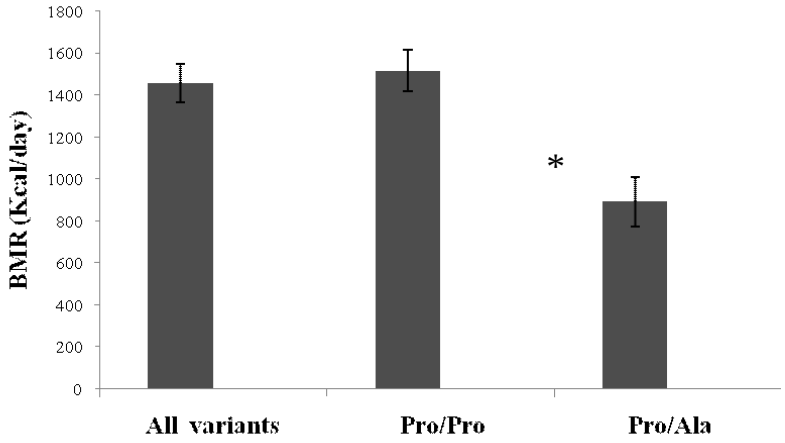
Πίνακας 4. *Κλινικά χαρακτηριστικά των γυναικών με PCOS women αναλόγως των διαφόρων τύπων SNP- 71 v. Τιμές σε μέσος όρος ± σταθερή απόκλιση (mean ± SD) p τιμές μεταξύ HSD-AA και HSD-AG τύπων*.

	PCOS-Total	HSD-AA	HSD-AG	HSD-GG	p
Ηλικία (έτη)	22.90 ±0.46	22.72±0.53	22.61±0.87	21.88±1.64	0.907
BMI(Kg/m^2)	26.04±0.67	25.65±0.76	26.06±1.22	25.08±3.92	0.776
Ινσουλίνη νηστείας(□IU/ml)	17.7±0.70	20.10±2.72	17.66±3.80	9.60±2.45	0.605
Γλυκόζη νηστείας/ Ινσουλίνη νηστείας	11.54±0.80	11.91±1.34	12.05±2.16	12.62±2.84	0.957
HOMA	76.69±6.43	80.73±9.66	77.85±13.02	84.13±18.21	0.861
QUICKI	0.355±0.00	0.358±0.00	0.356±0.00	0.364±0.01	0.840
Τεστοστερόνη (ng/ml)	0.75±0.18	0.72±0.44	0.88±0.06	0.90±0.17	0.035
Free Testosterone (pg/ml)	3.02±0.17	2.94±0.17	3.14±0.36	2.77±0.53	0.576
17-OH PRG (ng/ml)	1.24±0.12	1.21±0.08	1.22±0.14	1.29±0.22	0.951
Androstenedione (ng/ml)	3.30±0.13	3.36±0.14	3.23±0.25	2.62±0.33	0.649
Ratio Andro/Testo	5.63±0.15	5.93±0.53	4.28±0.44	4.09±1.06	0.018
Free Androgen Index F.A.I.	0.69±0.15	0.74±0.20	0.69±0.10	0.54±0.13	0.857

3. Γονίδιο του PPARγ και IRS1.

Οι συχνότητες των γονοτύπων των πολυμορφισμών των γονιδίων του Pro12Ala πυρηνικού υποδοχέα PPARγ2 και του Glu972Arg στο υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης-1 (IRS-1), εμφανίζονται στον Πίνακα 5. Καμία συσχέτιση των πολυμορφισμών με τον φαινότυπο του PCOS δεν ανιχνεύθηκε. Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της υπό ομάδας μελέτης εμφανίζονται στον Πίνακα 6. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις οι οποίες σχετίσθηκαν με τον PPARγ πολυμορφισμό έγιναν μεταξύ του Pro/Pro και του Pro/Ala μαζί με τούς Ala/Ala υποτύπους (X/Ala) και αυτών οι οποίοι συσχετίσθηκαν με το IRS-1 πολυμορφισμό μεταξύ του Gly/Gly και του Gly/Arg και των υποτύπων Arg/Arg (X/Arg), καθώς οι ομάδες των Ala/Ala και Arg/Arg ήταν πολύ μικρές ώστε να εμφανίσουν στατιστική δύναμη. Η παρουσία του πολυμορφισμού Pro12Ala του PPARγ2 συσχετίσθηκε με το BMR, καθώς οι φορείς του αλληλομόρφου Ala είχαν μικρότερο BMR συγκρινόμενες με τις γυναίκες Pro/Pro (p=0.04) **(Σχήμα 1)**.

Σχήμα 1: Βασικός Μεταβολικός Ρυθμός (BMR) σε γυναίκες με PCOS αναλόγως της παρουσίας των PPARγ Γονοτύπων
Τιμές σε mean±SD. P< 0.05



Ακολούθως εμείς χωρίσαμε τις γυναίκες με PCOS αναλόγως των δεικτών αντίστασης στην ινσουλίνη σε 2 υποομάδες: αυτές με IR (n=39) (Ινσουλίνη νηστείας>12mU/mL, Γλυκόζη νηστείας/Ινσουλίνη νηστείας<6.4, HOMA<47,QUICKI<0.333) και αυτές χωρίς αντίσταση στην ινσουλίνη (n=77) (Ινσουλίνη νηστείας<12mU/mL, Γλυκόζη νηστείας/Ινσουλίνη νηστείας>6.4, HOMA>47,QUICKI>0.333). Σαράντα (40) από τις 156 γυναίκες με PCOS δεν πληρούσαν τα κριτήρια για την αντίσταση στην ινσουλίνη και επομένως δεν συμπεριελήφθησαν στις δύο υποομάδες. Ανάμεσα στις γυναίκες με PCOS και με αντίσταση στην ινσουλίνη και σε αυτές χωρίς, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν ανιχνεύθηκε μεταξύ των ομάδων με το φυσιολογικό και το πολυμορφικό αλληλόμορφο σε σχέση με όλα τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά (p=ns).

<u>Πίνακας 5</u>: *Συχνότητες των γονοτύπων των πολυμορφισμών Pro12Ala του PPARγ2 και του Gly972Arg του IRS-1, σε γυναίκες με PCOS και βιοχημική υπερανδρογοναιμία και της ομάδας ελέγχου.*

	PPARγ2 Pro/Pro	**PPARγ2 Pro/Ala**	**PPARγ2 Ala/Ala**	**IRS-1 Gly/Gly**	**IRS-1 Gly/Arg**	**IRS-1 Arg/Arg**
Γυναίκες με PCOS	**n=136 (87.73%)**	**n=19 (11.66%)**	**n=1 (0.61%)**	**n=142 (90.8%)**	**n=14 (7.98%)**	**n=2 (1.22%)**
Ομάδα ελέγχου	**n=48 (85.72%)**	**n=6 (10.71%)**	**n=2 (3.57%)**	**n=49 (87.5%)**	**n=6 (10.71%)**	**n=1 (1.79%)**

Πίνακας 6 : *Κλινικά Χαρακτηριστικά των γυναικών με PCOS στους γονοτύπους του PPARγ2 και του IRS-1.Οι τιμές του p του PPARγ2 είναι μεταξύ Pro/Pro και X/Ala και οι τιμές του p του IRS-1 είναι μεταξύ του Gly/Gly και του X/Arg. Οι τιμές είναι (μέσος όρος ± σταθερή απόκλιση)*

	PCOS Σύνολο	PPARγ2 Pro/Pro	PPARγ2 X/Ala	IRS-1 Gly/Gly	IRS-1 X/Arg	PPARγ2 p	IRS-1 p
Ηλικία (έτη)	22.82±0.43	22.81±0.47	22.92±0.87	22.78±0.44	23.30±1.87	0.94	0.75
BMI (Kg/m^2)	25.7±0.61	25.79±0.67	24.83±1.07	25.72±0.63	25.44±2.4	0.65	0.90
Ινσουλίνη νηστείας (μIU/mL)	9.65±0.49	9.72±0.53	9.12±1.22	9.70±0.52	9.10±1.56	0.70	0.73
Γλυκόζη νηστείας /Ινσουλίνη νηστείας	11.85±1.08	11.98±1.19	10.75±1.65	11.95±1.16	10.68±1.56	0.73	0.75
HOMA	80.00±7.26	81.06±8.01	70.98±10.3	80.58±7.83	73.39±11.15	0.68	0.79
QUICKI	0.357±0.0	0.357±0.0	0.358±0.0	0.357±0.43	0.360±0.0	0.97	0.85
Τεστοστερόνη (ng/mL)	0.77±0.03	0.77±0.04	0.80±0.10	0.77±0.03	0.82±0.17	0.79	0.69
Ελευθ. Τεστοστερόνη (pg/mL)	2.99±0.15	2.40±0.18	3.11±0.36	3.06±0.17	2.19±0.25	0.79	0.12
17-OH Προγεστερόνη (ng/mL)	1.23±0.06	1.24±0.07	1.09±0.13	1.24±0.07	1.15±0.20	0.48	0.72
Ανδροστεν. (ng/mL)	3.31±0.12	3.30±0.12	3.40±0.40	3.31±0.12	3.25±0.33	0.79	0.89
Δείκτης Ελευθερων Ανδρογόνων (FAI)	0.70±0.13	0.73±0.11	0.47±0.11	0.72±0.14	0.38±0.15	0.55	0.51
Βασικός Μεταβολικός ρυθμός (BMR) (Kcal/day)	1456±91	1518±97	893±118	1481±96	1124±233	0.04	0.32

Δ. Συζήτηση.

1. Γονίδιο του αδρενεργικού υποδοχέα α_{2B}, β_3.

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης δεν έδειξαν στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των γυναικών με PCOS και της ομάδας ελέγχου σε σχέση με την κατανομή των γονοτύπων και την συχνότητα των α_{2B} και β_3 αλληλομόρφων.

Ο γονότυπος των Ελληνίδων για τον α_{2B} πολυμορφισμό έδειξε ότι η πλειοψηφία αυτών ήταν ομόζυγες για το αλληλόμορφο του υποδοχέα (Glu12/Glu12), ενώ στον Φιλανδικό πληθυσμό οι περισσότερες ήταν ετερόζυγες (321). Στην ομάδα μας ο πολυμορφικός υπότυπος του α_{2B} ήταν ασυνήθης, με μια συχνότητα του Glu^9 του 20%, σε σύγκριση με το 45% σε παχύσαρκους Φιλανδούς (321). Επιπλέον η κατανομή των γονοτύπων και των συχνοτήτων των αλληλομόρφων δεν διέφερε μεταξύ των γυναικών με PCOS και της ομάδας ελέγχου. Μαζί και τα δύο τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η συνολική επίπτωση του πολυμορφισμού του α_{2B} σε παχύσαρκους Έλληνες ασθενείς δεν είναι πιθανόν να είναι μεγάλη. Καθώς το 63% των ασθενών ήταν ομόζυγοι με Glu^{12}/Glu^{12} και μόνο το 2% ήταν ομόζυγοι Glu^9/Glu^9, όποια συσχέτιση μεταξύ του Glu^9 αλληλομόρφου και του PCOS ή των σχετικών παραμέτρων δεν μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον συνολικό πληθυσμό των ασθενών.

Το ανωτέρω συμπέρασμα είναι συμβατό με μια προηγούμενη μελέτη (322), η οποία δεν έδειξε συσχέτιση μεταξύ του γονιδίου του πολυμορφισμού του α_{2B} αδρενεργικού υποδοχέα και της νοσογόνου παχυσαρκίας σε Ελληνίδες. Αναφορικά με τον Ελληνικό πληθυσμό και λαμβάνοντας υπόψιν ότι το PCOS σχετίζεται με ήπια μορφή παχυσαρκίας αυτός ο πολυμορφισμός δεν φαίνεται να είναι σημαντικός τόσο με την απλή όσο και με την νοσογόνο παχυσαρκία.

Ο β_3 αδρενεργικός υποδοχέας είναι ο κύριος υποδοχέας ο οποίος προάγει την θερμογένεση και την λιπόλυση στον καφέ και λευκό λιπώδη ιστό.

Είναι αξιοσημείωτο ότι στην Ελλάδα σε μια μελέτη γυναικών με διαβήτη κύησης καμία συσχέτιση δεν ευρέθη εξαιτίας της χαμηλής επίπτωσης (7%) του πολυμορφισμού του β_3 γονιδίου στον Ελληνικό πληθυσμό (323). Επιπλέον, καμμία συσχέτιση του πολυμορφισμού του β_3 με το PCOS δεν έχει καταγραφεί ανάμεσα σε διαφορετικές εθνικές ομάδες (324), (325). Σε αυτή την μελέτη η επίπτωση του πολυμορφισμού του β_3 σε γυναίκες με PCOS ήταν η ίδια όπως και αυτή των φυσιολογικών Ελληνίδων (323).

Σε αυτήν την μελέτη επίσης εξετάσαμε την πιθανή συσχέτιση των τριών ομάδων γονοτύπων του α_{2B} αδρενεργικού υποδοχέα με το BMR και την αντίσταση στην ινσουλίνη ως μέρος του μεταβολικού συνδρόμου. Καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ του α_{2B} και του β_3 πολυμορφισμού του BMR και της αντίστασης στην ινσουλίνη δεν ευρέθη για όλους τους δείκτες οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για να καθορισθεί η αντίσταση στην ινσουλίνη (Γλυκόζη νηστείας, Ινσουλίνη νηστείας, HOMA, QUICKI, AUC για την γλυκόζη).

Τα γενετικά αίτια του BMR, της αντίστασης στην ινσουλίνη και του PCOS είναι γενικώς άγνωστα. Είναι πιθανόν ότι οι πολυμορφισμοί του α_{2B} και του β_3 μπορεί να έχουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια του μεταβολικού συνδρόμου,

αλλά εξαιτίας της πολυπλοκότητας του PCOS, η συσχέτιση των πολυμορφισμών με ειδικές παραμέτρους αυτής της μελέτης, μπορεί να είναι πολύ μικρή ώστε να ανιχνευθεί. Από ότι γνωρίζουμε αυτή είναι η πρώτη μελέτη η οποία αφορά το PCOS και λαμβάνει υπόψιν της το BMR και την αντίσταση στην ινσουλίνη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, δεν υπάρχει σημαντική λειτουργική σημασία του πολυμορφισμού του γονιδίου του α_{2B} και του β_3 στο PCOS. Φυσικά ο σχετικά μικρός αριθμός των ασθενών στην παρούσα μελέτη καθώς και η σπανιότητα του γονοτύπου Glu^9/ Glu^9 καταστεί προφανές το γεγονός ότι επιπρόσθετες μελέτες σε μεγαλύτερες ομάδες απαιτούνται, ώστε να εξαχθεί ένα οριστικό συμπέρασμα.

2. Γονίδιο του HSD17B5.

Το PCOS είναι μια διαταραχή η οποία προκαλεί υπερέκκριση ωοθηκικών ανδρογόνων και υπάρχουν αρκετά στοιχεία τα οποία δείχνουν ότι η ανώμαλη στεροειδογένεση στο PCOS, είναι αποτέλεσμα μιας εσωτερικής ανωμαλίας των κυττάρων της θήκης, γενετικής αιτιολογίας (326). Ακολούθως τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στην ωοθηκική στεροειδογένεση θεωρούνται υποψήφιοι για την υπερανδρογοναιμία και το PCOS.

Στην παρούσα μελέτη, εμείς θέσαμε το ερώτημα του εάν το -71A/G HSD17B5 SNP σχετίζεται με το PCOS και την υπερανδρογοναιμία σε μια ξεχωριστή φαινοτυπική ομάδα ασθενών με PCOS η οποία χαρακτηρίζεται από βιοχημική υπερανδρογοναιμία και χρόνια ανωοθηλακιορρηξία και πολυκυστικές ωοθήκες στον υπερηχογραφικό έλεγχο. Η επιλογή των ασθενών με PCOS οι

οποίοι συμπεριλαμβάνονταν στην μελέτη είναι ομογενοποιημένη σε σχέση με τον κλινικό φαινότυπο και ειδικότερα την παρουσία βοχημικής υπερανδρογοναιμίας και επομένως κατάλληλη για γενετική-φαινοτυπική μελέτη συσχέτισης ενός πολυμορφισμού του γονιδίου, που στο παρελθόν αναφέρθηκε ικανό να τροποποιήσει τα επίπεδα ανδρογόνων του ορού (327). Τα αποτελέσματα μας είναι σε μερική συμφωνία και σε μερική αντίθεση με προηγούμενες μελέτες (327-329).

Στο PCOS, οι περισσότερες μελέτες γενετικής συσχέτισης δείχνουν μια έλλειψη επαναληψιμότητας μεταξύ των διάφορων εθνικών ομάδων, ένα παγκόσμιο πρόβλημα που δεν αφορά μόνο το PCOS αλλά και άλλα σύνδρομα. Όσον αφορά το PCOS η παρατηρούμενη έλλειψη της συμφωνίας των αποτελεσμάτων των μελετών η οποία παρατηρείται οφείλεται σε δύο αιτίες: 1) την φαινοτυπική ετερογένεια μέσα στους PCOS ασθενείς και 2) τα στατιστικά λάθη τα οποία οδηγούν σε ψευδώς αρνητικά/θετικά αποτελέσματα είτε λόγω μικρού αριθμού ατόμων, είτε λόγω σφαλμάτων κατά την στατιστική επεξεργασία.

Το PCOS περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα φαινοτύπων το οποίο καθιστά ομιχλώδη την διάγνωση, προκαλώντας μια αντιπαράθεση στην κλινική ενδοκρινολογία σε σχέση με τον ορισμό της διάγνωσης του συνδρόμου (330). Στην παρούσα φάση η διάγνωση του PCOS βασίζεται στα αναθεωρημένα κριτήρια του Ρότερνταμ ESHRE/ASRM 2003 (331). Τα αναθεωρημένα κριτήρια περιλαμβάνουν δύο επιπρόσθετους φαινοτύπους, αυτές με τις διαταραχές εμμήνου ρύσεως και της πολυκυστικής μορφολογίας στους υπερήχους και αυτούς με κλινική και/ή βιοχημική υπερανδρογοναιμία και πολυκυστική ωοθηκική μορφολογία στον υπερηχογραφικό έλεγχο για τον

οποίον υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία τα τελευταία λίγα χρόνια, ότι αντιπροσωπεύουν ήπιες μορφές του συνδρόμου (332,333). Αντιθέτως οι φαινότυποι οι οποίοι περιλαμβάνουν την υπερανδρογοναιμία και την χρόνια ανωοθηλακιορρηξία φαίνεται να προσβάλλονται σοβαρά με υπερανδρογοναιμία, αντίσταση στην ινσουλίνη και παχυσαρκία (333).

Έτσι οι γενετικές μελέτες οι οποίες διεξάγονται από διάφορους ερευνητές αποτελούνται από διαφορετικές υποομάδες, μια τακτική η οποία περιπλέκει την αναγνώριση των ποικιλιών γονοτύπων τα οποία εξασκούν μέτρια η ελάσσονα αποτελέσματα σε ειδικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως η υπερανδρογοναιμία.

Το -71A/G HSD17B5 SNP ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Qin και συν. Σε ένα ασθενή με υπερθήκωση ο οποίος ήταν ομόζυγος για το G αλληλόμορφο και έδειξε ένα άρρεν φαινότυπο στο τέστ με τον GnRH αγωνιστή (174). Το -71G HSD17B5 αλληλόμορφο αποδείχθηκε να είναι πολυμορφισμός μετά από γονοτύπιση 121 ατόμων με PCOS και 128 φυσιολογικών ατόμων. Η περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων αποκάλυψε ότι η παρουσία του G αλληλομόρφου σχετίζεται με υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης ορού και το PCOS. Επακόλουθες λειτουργικές in vitro μετρήσεις έδειξαν ότι ο υποκείμενος μοριακός μηχανισμός είναι μια μέτρια αύξηση στην έκφραση του HSD17B5 γονιδίου εξαιτίας της υψηλής συγγένειας του G αλληλομόρφου για τους μεταγραφικούς παράγοντες Sp1/Sp3 (327).

Ο Goodarzi και συν. σε μια προσπάθεια να αναπαράγουν την αναφερόμενη συσχέτιση από τον Qin και τους συν. γονοτύπισαν Καυκάσιες γυναίκες με PCOS για το-71A/G HSD17B5 SNP και επιπλέον 5 SNPs. Ωστόσο ούτε η

συσχέτιση του -71G με το PCOS αλλά ούτε και η συσχέτιση του με υψηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης επιβεβαιώθηκε (328). Οι ίδιες αρνητικές συσχετίσεις οι οποίες αφορούν όλα τα γνωστά SNPs του HSD17B5 γονιδίου, έχουν αναφερθεί από τον C.J.Petry και τους συν. σε κορίτσια με πρόωρη εμμηναρχή η οποία μπορεί να αποτελεί πρόδρομο PCOS (329). Η ανακολουθία μεταξύ του Qin και των συν. και των αποτελεσμάτων μας όσον αφορά την συσχέτιση του -71G τύπου μπορεί να οφείλεται στην στρατολόγηση του πληθυσμού. Η στρατολόγηση αυτή του πληθυσμού συμβαίνει εξαιτίας της μίξης των πληθυσμών με ποικιλίες αλληλομόρφων με διαφορετικές συχνότητες και διαφορετικά ποσοστά νόσου και/ή διαφορετικές τιμές χαρακτηριστικών από μία μονήρη μελέτη (334,335). Εξαιτίας των διαφορών με τους μέσους φαινοτύπους ανάμεσα στους πληθυσμούς, οι Καυκάσιοι συνολικά αντιπροσωπεύουν ένα δυσανάλογο τμήμα ατόμων με λίγα χαρακτηριστικά στην μελέτη του Qin.

Για να αποφευχθεί η ανίχνευση συστηματικών προγονικών διαφορών, παρά η συσχέτιση των γονιδίων με την νόσο, τόσο οι ασθενείς όσο και η ομάδα ελέγχου θα πρέπει να ταυτισθεί όσον αφορά το γενετικό υπόβαθρο. Παρόλα αυτά ο Qin και οι συν. το 2006 βάσισαν την μελέτη τους σε ομάδες με διαφορετική σύσταση. Επιπλέον οι Αφροαμερικανοί αποτελούν μια ομάδα με εσωτερικά ετερογενές γενετικό υπόβαθρο (327) το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε κρυφή στρατολόγηση του πληθυσμού. Αυτός είναι ο λόγος ο οποίος ακόμα και μελέτες με μικρές ομάδες είναι αξιοπρόσεκτες σε εθνικά ομοιογενείς πληθυσμούς όταν προσπαθούμε να αναδείξουμε διαφορετικούς συσχετισμούς με πολύπλοκα γενετικά χαρακτηριστικά.

Παρά τις διαφορές στις γονιδιακές συχνότητες και τους μέσους φαινότυπους μεταξύ των πληθυσμών διαφορετικής εθνικής καταγωγής, η φαινοτυπική επίπτωση ενός συγκεκριμένου γονιδίου και η υποκείμενη γενετική βάση της νόσου αναμένεται να είναι η ίδια. Επομένως η σχέση των επιπέδων τεστοστερόνης του ορού με το -71G αλληλόμορφο φαίνεται να είναι αληθώς θετική.

Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με τον Goodarzi και συν. οι οποίοι το 2008 δεν βρήκαν συσχέτιση με το HSD17B5 G αλληλόμορφο και το PCOS (328). Σε περίπτωση κατά την οποία υπήρχε κάποια σχέση θα ήταν περισσότερο εμφανής σε ένα ομογενή εθνικά πληθυσμό Καυκασίων γυναικών με PCOS και υπερανδρογοναιμία καθώς το 71G HSD17B5 αλληλόμορφο ρυθμίζει την παραγωγή τεστοστερόνης. Επομένως τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, επιβεβαιώνουν το προηγούμενο αποτέλεσμα ότι ο πολυμορφισμός δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην γενετική παθογένεια του PCOS. Σύμφωνα με τα κριτήρια της AES (Androgen Excess Society), η ελεύθερη τεστοστερόνη είναι το αξιολογότερο ανδρογόνο του ορού σε σχέση με την κλινική σημασία (337). Το αλληλόμορφο -71 είναι ικανό να τροποποιήσει τα κυκλοφορούντα επίπεδα ολικής τεστοστερόνης του ορού η οποία παράγεται από την μετατροπή της ανδροστενεδιόνης. Επομένως η κλινική της σημασία μπορεί να είναι ελάσσονα καθώς η ελεύθερη τεστοστερόνη αντιπροσωπεύει το 2% της ολικής τεστοστερόνης του ορού. Ο Qin και συν. ανέφεραν ότι ο πολυμορφισμός μπορεί να είναι υπεύθυνος για ένα 20% των τιμών της ολικής τεστοστερόνης του ορού. Σχετικά με την θετική συσχέτιση του 71G HSD17B5 αλληλομόρφου με τα υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης, ο Goodarzi και συν. σωστά δεν αναπαρήγαν τα αποτελέσματα καθώς η ομάδα τους των ασθενών

PCOS συμπεριελάμβανε πάνω από μία φαινοτυπική ομάδα σε σχέση με την υπερανδρογοναιμία. Σύμφωνα με τα κριτήρια του Goodarzi και συν. ο ορισμός για το PCOS συμπεριελάμβανε γυναίκες με/ή βιοχημική υπερανδρογοναιμία και διαταραχές εμμήνου ρύσεως. Η ομάδα των γυναικών με PCOS με κλινική και όχι βιοημική υπερναδρογοναιμία η οποία συμπεριελήφθηκε στην ομάδα του Qin μπορεί να συνεισφέρει στην αναφερθείσα έλλειψη συσχέτισης, η οποία για να εκφρασθεί μπορεί να χρειάζεται το αυξημένο υπόστρωμα των ανδρογόνων.

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν την σημασία της ταξινόμησης των γυναικών με PCOS σε διαφορετικές ομάδες στην διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών οι οποίοι ενέχονται στην εμφάνιση ποσοτικών κλινικών υποκείμενη χαρακτηριστικών του συνδρόμου. Λαμβάνοντας υπόψιν τις τρεις μελέτες, μπορεί να τονισθεί ότι το 71G HSD17B5 δεν είναι κύριο συστατικό του μοριακού παθογενετικού μηχανισμού του PCOS, και παρόλα αυτά συνεισφέρει στην βαρύτητα της υπερανδρογοναιμίας των PCOS ασθενών με βιοχημική υπερανδρογοναιμία. Επιπροσθέτως στις γυναίκες με PCOS συχνά αναφέρεται αύξηση της ανδροστενεδιόνης του ορού, επομένως έχουν αυξημένο υπόστρωμα για την παραγωγή τεστοστερόνης. Έτσι η κλινική σημασία του πολυμορφισμού είναι σπουδαιότερη σε γυναίκες με PCOS σε σύγκριση με φυσιολογικές, μη τριχωτές γυναίκες. Το ίδιο αποτέλεσμα αναφέρθηκε με τούς CYP11a 5'-UTR $(tttta)_n$ τύπους οι οποίοι ήταν αυξημένοι στις PCOS γυναίκες αλλά όχι στην υγιή ομάδα ελέγχου (338). Επομένως η αυξημένη παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης μπορεί να αποδοθεί σε μεταγραφική δυσλειτουργία των ενζύμων τα οποία εμπλέκονται στην στεροειδογένεση (339), οδηγούμενη από την αλληλεπίδραση ενός

διαφορετικού γενετικού υποβάθρου και πολλαπλών γενετικών τόπων καθένας από τους οποίους έχει ήπια φαινοτυπικά αποτελέσματα.

Συμπερασματικά το 71G HSD17B5 αλληλόμορφο δεν είναι το κύριο συστατικό των μοριακών παθογενετικών μηχανισμών του PCOS, αλλά μπορεί να συνεισφέρει στην βαρύτητα της υπερανδρογοναιμίας σε γυναίκες με PCOS και βιοχημική υπερανδρογοναιμία.

3. Γονίδιο του PPARγ και IRS1.

Στην παρούσα μελέτη, εμείς θέσαμε το ερώτημα του εάν το Pro12Ala PPARγ2 SNP και το Gly972Arg IRS-1 SNP σχετίζονται με τον φαινότυπο του PCOS και τα ποσοτικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου σχετίζονται με τα σημασμένα από ινσουλίνη μονοπάτια σε μία ξεχωριστή φαινοτυπική ομάδα ασθενών με PCOS οι οποίοι χαρακτηρίζονταν από βιοχημική υπερανδρογοναιμία, χρόνια ανωοθηλακιορρηξία και πολυκυστικές ωοθήκες στους υπερήχους.

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι στις γυναίκες με PCOS η παρουσία του πολυμορφισμού Pro12Ala στο γονίδιο του PPARγ σχετίζεται με χαμηλό βασικό μεταβολικό ρυθμό (BMR). Δεδομένου του διπλού ρόλου του PPARγ στην λιπογένεση και στην ρύθμιση των γεγονότων από την ενδοκυττάρια σήμανση της ινσουλίνης αυτό το μόριο βρίσκεται σε πλεονεκτική θέση στην λίστα με τα διάφορα υποψήφια γονίδια τα οποία εμπλέκονται σε νοσήματα με πολυπαραγοντική κληρονομικότητα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, το PCOS και ο καρκίνος (340).

Αναφορικά με τις συχνότητες των αλληλομόρφων Pro12Ala, τα ευρήματα μας είναι σύμφωνα με την πλειοψηφεία των μελετών οι οποίες δεν ανίχνευσαν

καμία διαφορά μεταξύ των γυναικών με PCOS και του γενικού πληθυσμού (341-349). Αντιθέτως, σε μια Φιλανδική μελέτη γυναικών με PCOS (350), η συχνότητα του αλληλομόρφου Ala βρέθηκε να ελαττώνεται με κάποια σημασία, υποδεικνύοντας ένα προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη του συνδρόμου. Παρά την γενική συμφωνία η οποία αφορά τις συχνότητες των γονιδίων, αρκετές μελέτες ανέφεραν διαφορετικές συσχετίσεις του Pro12Ala πολυμορφισμού στο γονίδιο PPARγ2 με διάφορα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της υπερανδρογοναιμίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη (IR) σε γυναίκες με PCOS. Ο Xara και συν. το 2002 (343) σε μια πολυεθνική μελέτη παχύσαρκων PCOS ασθενών, ανέφεραν ότι οι φορείς του αλληλόμορφου Ala ήταν περισσότερο ευαίσθητοι στην ινσουλίνη και εμφάνισαν μια τάση για χαμηλότερα επίπεδα ολικής και ελεύθερης τεστοστερόνης ορού. Ο Hahn και οι συν. το 2005 (351) ανέφεραν χαμηλότερη υπερινσουλιναιμία και όλες τις παραμέτρους αντίστασης στην ινσουλίνη σε παχύσαρκους ασθενείς αλλά όχι σε αδύνατους ασθενείς με PCOS οι οποίοι έφεραν το αλληλόμορφο Ala. Ο Τοκ και συν. το 2005 (352) ανέφεραν ότι οι αδύνατες γυναίκες με Pro12Ala είχαν σημαντικά υψηλότερο BMI, ενώ αντίθετα ο Yilmaz και συν. το 2006 σε ένα πληθυσμό παρόμοιας εθνικής καταγωγής αδυνάτων γυναικών με PCOS, ανέφεραν μια συσχέτιση του Pro12Ala με χαμηλότερο BMI και χαμηλότερο λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια γλουτών, ελαττωμένα επίπεδα ανδρογόνων, λιγότερη τριχοφυΐα, και χαμηλότερο δείκτη αντίστασης στην ινσουλίνη (353).

Επίσης στην παρούσα μελέτη μας, δεν ανιχνεύτηκε καμία συσχέτιση του πολυμορφισμού Pro12Ala με το δείκτη σωματικού βάρους (BMI) και την ομοιόσταση της γλυκόζης, παρόλα αυτά μια σημαντική συσχέτιση της

παρουσίας του Ala αλληλομόρφου με το χαμηλότερο BMI βρέθηκε. Από ότι μας είναι γνωστό, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που έδειξε συσχέτιση του Pro12Ala πολυμορφισμού με χαμηλότερο BMR σε γυναίκες με PCOS. Μελέτες συσχέτισης του πολυμορφισμού Pro12Ala σε πληθυσμούς διαφορετικού BMI έδειξαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ανάμεσα σε φυσιολογικού βάρους ή ελαφρά υπέρβαρων ατόμων το αλληλόμορφο Ala12 σχετίσθηκε με χαμηλότερο από το μέσο BMI (354).

Ο Beamer και συν. το 1998 σε δύο ανεξάρτητους πληθυσμούς Καυκασίων βρήκαν ότι το Pro12Ala σχετίσθηκε με υψηλότερο BMI σε άτομα με νοσογόνο παχυσαρκία, ενώ σε αδύνατους προς μέτριους ασθενείς υπήρχε μια τάση προς ένα υψηλότερο BMI, το οποίο δεν έφτασε σε μια σημαντική στατιστική διαφορά (355). Επιπλέον ο Valve και συν. το 1999 ανέφεραν μια συσχέτιση του πολυμορφισμού του γονιδίου Pro12Ala στο PPARγ γονίδιο με σοβαρή αύξηση του βάρους και αύξηση της λιπώδους μάζας ανάμεσα σε παχύσαρκες γυναίκες (356). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μια γενετική ποικιλομορφία στον PPAR- επίτοπο μπορεί να προκαλέσει την τάση για παχυσαρκία στους ανθρώπους με διάφορους τρόπους. Το Ala αλληλόμορφο έχει δειχθεί ότι εμφανίζει λιγότερη συγγένεια και διαδραστική ικανότητα από ότι το Pro αλληλόμορφο στις κυτταρικές σειρές των προλιποκυττάρων (pre-adipocytes), ενώ τόσο η ευαισθησία στην ινσουλίνη της επεξεργασίας της γλυκόζης και της λιπόλυσης ήταν υψηλότερες σε άτομα τα οποία έφεραν το Ala αλληλόμορφο (357). Πράγματι στην μελέτη μας μια τάση η οποία δεν έφτασε σε στατιστική σημαντικότητα για χαμηλότερα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας παρατηρήθηκε για άτομα τα οποία έφεραν το αλληλόμορφο Ala. Δεδομένου του γεγονότος ότι η έκφραση του mRNA του PPARγ αυξάνεται

στον λιπώδη ιστό σε παχύσαρκους και μειώνεται σε άτομα με χαμηλή θερμιδική δίαιτα, η λειτουργική σημασία της αντικατάστασης Pro12Ala μπορεί να εξαρτάται από τις αποθήκες ενέργειας και να είναι διαφορετικό ανάμεσα στα φυσιολογικού βάρους, υπέρβαρα και με νοσογόνο παχυσαρκία άτομα (358). Αυτή η παρατήρηση μπορεί εν μέρει να εξηγήσει τις αντικρουόμενες συσχετίσεις του αλληλομόρφου Ala σε διάφορους πληθυσμούς.

Το εύρημα ότι η παρουσία του αλληλομόρφου Ala στα λιποκύτταρα, μέσω της αλλαγής μεταγραφικής δραστικότητας του υποδοχέα, υποστηρίζει την δράση της ινσουλίνης στην καταστολή της λιπόλυσης, δείχνει μια αλλαγή στην ισορροπία λιπόλυσης-λιπογένεσης προς την κατεύθυνση της λιπογένεσης. Άτομα με ευαισθησία στην δράση της ινσουλίνης είναι περισσότερο πιθανό να πάρουν βάρος από ότι άτομα με αντίσταση στην ινσουλίνη (358), έτσι τα άτομα τα οποία φέρουν το αλληλόμορφο Ala στην ομάδα μας έχουν αυξημένη τάση να πάρουν βάρος. Από ότι γνωρίζουμε μια περιστασιακή σχέση του πολυμορφισμού Pro12Ala με το BMR ερευνήθηκε μόνο μια φορά σε μια ομάδα ιδιαίτερα παχυσάρκων ασθενών, αλλά ποτέ σε γυναίκες με PCOS. Σε αυτή την μελέτη ο Valve και συν. δεν ανίχνευσε καμία συσχέτιση του πολυμορφισμού του Pro12Ala με το BMR. Αυτή η ανακολουθία μπορεί να οφείλεται στην παρουσία αυξημένης έκφρασης του PPARγ από υπερβολική μάζα του λίπους, το οποίο αναστέλλει την επαγόμενη από ινσουλίνη λιπόλυση, μέσω μεταγραφικών αλλαγών εξαιτίας του πολυμορφισμού του Pro12Ala. Επομένως η επιρροή του πολυμορφισμού του Pro12Ala στο BMR δεν σημαίνει απαραίτητα υψηλό μέσο BMI, καθώς προσφάτως δείξαμε ελαττωμένο BMR σε αδύνατες PCOS γυναίκες (359). Ένα σημαντικό ζήτημα στην μελέτη μας είναι ότι στην ομάδα ελέγχου την οποία χρησιμοποιήσαμε για

τον καθορισμό των συχνοτήτων δεν μετρήθηκε το BMR, επομένως περαιτέρω μελέτες χρειάζονται ώστε να καθορισθεί ο βαθμός της επίδρασης του πολυμορφισμού του γονιδίου του Pro12Ala στο BMR σε διαφόρους πληθυσμούς υπέρβαρων, παχύσαρκων και με νοσογόνο παχυσαρκία ασθενών.

Αναφορικά με τις συχνότητες των Gly972Arg αλληλομόρφων του IRS-1 γονιδίου των γυναικών με PCOS, οι αναφορές από την βιβλιογραφία είναι αντιφατικές. Τα αποτελέσματα από διάφορες μελέτες πολύ δύσκολα συγκρίνονται μεταξύ τους καθώς οι ερευνητές εφαρμόζουν διαφορετικά κριτήρια στην επιλογή των ασθενών με PCOS. Αυτές οι μελέτες αφορούν λεπτές ή παχύσαρκες γυναίκες, οι οποίες εμφανίζονται με ή χωρίς αντίσταση στην ινσουλίνη και είναι διαφορετικής εθνικής καταγωγής. Παρόλο που κανένας συσχετισμός του Gly972Arg SNP δεν βρέθηκε, σε μια αρχική προσπάθεια να συσχετισθούν διάφορα υποψήφια γονίδια με το PCOS (360), ο δυναμικός ρόλος αυτού του τύπου στην παθογένεια του PCOS έχει ευρέως διερευνηθεί. Η πλειοψηφία αυτών των μελετών, σε συμφωνία με τα ευρήματα μας, δεν ανέφερε διαφορά στις συχνότητες των αλληλομόρφων στις PCOS γυναίκες και στον γενικό πληθυσμό (361). Αντιθέτως, ο Sir-Petermann το 2004 και συν. (362) καθώς και ο Dilek και συν. το 2005 (363) ανέφεραν υψηλότερη συχνότητα του αλληλομόρφου Arg972 σε γυναίκες με PCOS και επιπροσθέτως μια συσχέτιση του πολυμορφισμού με μείωση της έκκρισης ινσουλίνης.

Σε διάφορες μελέτες η παρουσία του Gly972Arg SNP έχει συσχετισθεί με διάφορα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της αντίστασης στην ινσουλίνη (IR) και της παχυσαρκίας. Ο El Mkadem και συν. το 2001 (361) ανέφεραν ότι

Gly972Arg SNP ήταν περισσότερο εμφανής σε γυναίκες με αντίσταση στην ινσουλίνη συγκρινόμενες με αυτές χωρίς αντίσταση αλλά και με φυσιολογικές γυναίκες της ομάδας ελέγχου. Ο Ehrmann και συν. το 2002 (360) ανέφεραν ότι μόνο οι ομόζυγες γυναίκες Gly/Gly εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης στις 2 hr σε αντίθεση με τους φορείς Arg, ενώ ο Villuendas και συν. το 2005 (364) έδειξαν ότι στις ισπανίδες με PCOS ο γενετικός τύπος επηρεάζει την ομοιοστασία της γλυκόζης και την παχυσαρκία. Ο Dilek (363) βρήκε ότι οι φορείς Gly972Arg ήταν περισσότερο παχύσαρκοι, είχαν περισσότερο αντίσταση στην ινσουλίνη και είχαν υψηλότερα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας όταν έρχονταν σε αντιπαράθεση με άλλες PCOS γυναίκες και την ομάδα ελέγχου. Στην ομάδα μας των νέων, λεπτών και υπερανδρογοναιμικών γυναικών με PCOS η παρουσία του Gly972Arg SNP δεν σχετίσθηκε με την ομοιοστασία της γλυκόζης την αντίσταση στην ινσουλίνη (IR) και το BMI.

Έμφαση πρέπει να δοθεί στην ιδιαίτερη φροντίδα στα κριτήρια επιλογής με τα οποία οι γυναίκες με PCOS επιλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη, έτσι ώστε να αποφύγουμε ένα από τα κύρια προβλήματα των περισσοτέρων γενετικών μελετών που αφορούν πολύπλοκα κλινικά χαρακτηριστικά και κυρίως την φαινοτυπική ετερογένεια των ασθενών. Το PCOS εμπεριέχει ένα ευρύ φάσμα φαινοτύπων το οποίο συσκοτίζει την διάγνωση δημιουργώντας αντιπαράθεση στην κλινική ενδοκρινολογία όσον αφορά τον ορισμό και την διάγνωση του συνδρόμου (330). Έτσι οι γενετικές μελέτες οι οποίες διεξήχθησαν από διάφορους ερευνητές εμπεριέχουν διαφορετικές φαινοτυπικές υποομάδες, μια τακτική η οποία περιπλέκει την αναγνώριση των γονοτύπων οι οποίοι έχουν μέτριο ή μικρό αποτέλεσμα σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως η αντίσταση

στην ινσουλίνη και η ομοιοστασία της γλυκόζης. Οι γυναίκες με PCOS της μελέτης μας πληρούσαν τόσο τα διαγνωστικά κριτήρια του NIH 1990 και τα αναθεωρημένα κριτήρια του Ρότερνταμ ESHRE/ASRM 2003 (331), έχοντας έτσι την βαρύτερη μορφή του PCOS με βιοχημική υπερανδρογοναιμία και χρόνια ανωοθηλακιορηξία, αποτελώντας έτσι ένα ιδανικό πληθυσμό για γονοτυπική ανάλυση.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της μελέτης μας δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός Pro12Ala του γονιδίου PPARγ2 σχετίζεται με μειωμένο βασικό μεταβολικό ρυθμό (BMR) σε γυναίκες με σύνδρομο Πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) και βιοχημική υπερανδρογοναιμία. Επομένως αυτές οι νεαρές κοπέλες βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο να αυξήσουν το σωματικό τους βάρος να περιορίσουν την πρόσληψη ενέργειας μέσω της δίαιτας τους και να αυξήσουν με την άσκηση την κατανάλωση ενέργειας.

Β Ι Β Λ Ι Ο Γ Ρ Α Φ Ι Α

1. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. N Engl J Med 2005; 352: 1223-36.
2. Stein IF,Leventhal ML 1935 Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries.Am J Obstet Gynecol 29:181-191.
3. Chereau A 1844 Memoires pour server a l' etude des maladies des ovaries.Paris:Fortin,Masson,Cie.
4. Rokitansky C 1844.Amanual of pathological anatomy.Vol. 2 Philadelphia : Blanchard ,Lea 1855:246 (tr.by Edward Sieveking from original German edition of 1844)
5. Zawadski JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: Towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GE, eds. Polycystic Ovary Syndrome. Current Issues in Endocrinology and Metabolism. Boston: Blackwell, 1992: 377-84.
6. 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 (PCOS). Hum Reprod 2004; 19: 41-7.
7. 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 (PCOS). Fertil Steril 2004; 81:19-25.

8. Azziz R. Controversy in clinical endocrinology diagnosis of polycystic ovarian syndrome: the Rotterdam criteria are premature. J Clin Endocrinol Metab 2006; 90: 781-5.
9. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:3078-3082.
10. Diamanti-Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, et al.A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos :hormonal and metabolic profile. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:4006 – 4011.
11. Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar – Morreale HF.A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:2434-2438.
12. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 2745- 2749.
13. Dunaif A, Givens JR,Haseltine F,,Merriam GR.The Polycystic Ovary Syndrome .Boston :Blackwell Scientific ;1992.
14. Franks S 1995 Polycystic ovary syndrome. New Eng. J.Med.333:853-859β
15. Ferriman D & Gallwey J.Clinical assessment of body hair growth in women. J Clin Endocrinol Metab 1961; 21: 1440-1447.

16. Carmina E, J Obst Gynecol 167:1807-1812, 1992.
17. Πανίδης Δ, Ρούσσος Δ. Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών :□□. Κλινικά χαρακτηριστικά, ενδοκρινολογικά ευρήματα και διαγνωστική προσέγγιση. Εφηβ Γυν Αναπ Εμμην 1992,4(3):218-229.
18. Balen AH, Conway GS, Kaltsas G, et al. Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. Human Reproduction 1995; 10: 2107–2111.
19. Azziz R, Nestler HE, Dewailly D.Androgen excess disorders in Women. Polycystic Ovary Syndrome and Other Disorders. Humana Press, Totowa, New Jersey , USA, second edition,2006.
20. Slayden SM, Moran C, Sams Jr WM, et al. Hyperandrogenemia in patients presenting with acne. Fertility and Sterility 2001; 75: 889–892.
21. Falsetti L, Gambera A, Andrico S & Sartori E. Acne and hirsutism in polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine-metabolic and ultrasonographic differences. Gynecological Endocrinology 2002; 16: 275–284.
22. Κρεατσάς Γ. Παθολογία του εμμηνορυσιακού κύκλου ,Υπερανδρογοναιμία. Σύγχρονη γυναικολογία και μαιευτική ,Τόμος 1 : 107-132
23. Cremoncini C, Vignati L, Libroia A. Treatment of hirsutism and acne in women with two combinations of cyproterone acetate and ethinylestradiol.Acta Eur Fertil 1970;7:298
24. Cela E, Robertson C, Rush K, et al. Prevalence of polycystic ovaries in women with androgenic alopecia. Europ J Endocrinol 2003; 149: 439–442.

25. Franks S. Polycystic ovary syndrome: a changing perspective. Clinical Endocrinolology (Oxford) 1989; 31: 87–120.
26. Pollack S, Furth E, Kallen C, et al: Localization of the steroidogenic acute regulatory protein in human tissues. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:4243
27. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL: Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. Endocrin Rev 1995;16:322.
28. Conley A, Bird I: The role of cytochrome P450 17ct-hydroxylase and 3β-HSD in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the Δ5- and A4-pathways of steroidogenesis in mammals. Biol Reprod 1997;56:789.
29. Rheaume E, Lachance Y, Zhao H, et al: Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3β-hydroxysteroid dehydrogenase/ A5-A4-isomerase in human adrenals and gonads. Mol Endocrinol 1991;5:1147.
30. McAllister J, Kerin J, Trant J, et al: Regulation of cholesterol side-chain cleavage and 17a-hydroxylase/lyase activities in proliferating human theca interna cells in long term monolayer culture. Endocrinology 1989;125:1959
31. DiBlasio A, Voutilainen R, Jaffe R, et al: Hormonal regulation of messenger ribonucleic acids for P450scc (cholesterol side-chain cleavage enzyme) and P450cl7 (17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase) in cultured human fetal adrenal cells. J Clin Endocrinol Metab 198765:170

32. Zhang L-H, Rodriguez H, Ohno S, et al: Serine phosphorylation of human P450cl7 increases 17,20-lyase activity: Implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:10619

33. Hillier S, Tetsuka M: Role of androgens in follicle maturation and atresia. Bailliere's Clin Obstet Gynaecol 1997;11:249

34. Polan ML, Seu D, Tarlatzis B: Human chorionic gonadotropin stimulation of estradiol production and androgen antagonism of gonadotropin-stimulated responses in cultured human granulosa-luteal cells. J Clin Endocrinol Metab 1986;62:628

35. Nobels F, Dewailly D: Puberty and polycystic ovarian syndrome: The insulin/ insulin-like growth factor I hypothesis. Fertil Steril 1992;58:655 Hillier S, Wickings E, Illingworth P, et al: Control of inhibin production by human granulosa cells. Clin Endocrinol 1991;35:71

36. Hillier S, Yong E, Illingworth P, et al: Effect of recombinant activin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. J Clin Endocrinol Metab 1991;72:1206

37. Gougeon A: Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. Endocrin Rev 1996;17:121

38. Adashi E, Resnick C, D'Ercole A, et al: Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. Endocr Rev 1985;6:400

39. Mason H, Franks S: Local control of ovarian steroidogenesis. 104. Prelevic G, Wurzburger M, Balint-Peri C, et al: Inhibitory effect of sandostatin on secretion of luteinizing hormone and ovarian steroids in

polycystic ovary syndrome. Bailliere's Clin Obstet Gynaecol 1997;11:261

40. Miro F, Hillier S: Relative effects of activin and inhibin on steroid hormone synthesis in primate granulosa cells. J Clin Endocrinol Metab 1992;*75*:1556
41. Rosenfield RL, Qin K: Normal adrenarche. *In* Rose BD (ed): UpToDate. Wellesley, MA, UpToDate, 1998
42. Rich BH, Rosenfield RL, Lucky AW, et al: Adrenarche: Changing adrenal response to adrenocorticotropic J Clin Endocrinol Metab 1981;52:1129
43. Kennerson A, McDonald D, Adams J: Dehydroepiandrosterone sulfotransferase Io calization in human adrenal glands: A light and electron microscopic study. J Clin Endocrinol Metab 1983;56:786
44. Dickerman Z, Grant D, Faiman C, et al: intraadienal steroid concentrations in man: Zonal differences and developmental changes. J Clin Endocrinol Metab 1984;59:1031
45. Cumming D, Rebar R, Hopper B, et al: Evidence for an influence of the ovary on circulating dehydroepiandrosterone sulfate levels. J Clin Endocrinol Metab 1982;54:1069
46. de Peretti E, Forest M: Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood: Evidence for testicular production. J Clin Endocrinol Metab 1978;47:572,
47. Rittmaster R, Givner M: Effect of dailv and alternate dav low dose prednisone on serum Cortisol and adrenal androgens in hirsute women. J Clin Endocrinol Metab 1988;67:400

48. Smith R, Mesiano S, Chan E-C, et al: Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. J Clin Endocrinol Metab 1998 83:2916,
49. Erden H, Zwain I, Asakura H, et al: Corticotropin-releasing factor inhibits luteinizing hormone-stimulated P450cl7 gene expression and androgen production by isolated thecal cells of human ovarian follicles. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:448
50. Miller W, Auchus R, Geller D: The regulation of 17,20 lyase activity. Steroids 1997;62:133
51. Bleau G, Roberts K, Chapdelaine A: The in vitro and in vivo uptake and metabolism of steroids in human adipose tissue. J Clin Endocrinol Metab 1974;39:236
52. Haning RV Jr, Hackett RJ, Flood CA, et al: Plasma dehydroepiandrosterone sulfate serves as a prehormone for 48% of follicular fluid testosterone during treatment with menotropins. J Clin Endocrinol Metab 1993;76:1301
53. Kirschner M, Bardin C: Androgen production and metabolism in normal and virilized women. Metabolism 1972;21:667
54. Edman CD, MacDonald PC: Effect of obesity on conversion of plasma androstenedi-one to estrone in ovulatory and anovulatory young women. Am J Obstet Gynecol 1978;130:456
55. Kim M, Rosenfield R, Hosseinian A, et al: Ovarian hyperandrogenism with normal and abnormal histologic findings of the ovaries. Am J Obstet Gynecol 134:445, 19

56. Rittmaster R, Givner M: Effect of dailv and alternate day low dose prednisone on serum Cortisol and adrenal androgens in hirsute women. J Clin Endocrinol Metab 1988;67:400

57. Barnes RB, Rosenfield RL: The polycystic ovary syndrome: Pathogenesis and treatment. Ann Intern Med 1989;110:386

58. Conley A, Bird I: The role of cytochrome P450 c17-hydroxylase and 3β-HSD in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the Δ5- and A4-pathways of steroidogenesis in mammals. Biol Reprod 1997;56:789

59. Ehrmann DA, Rosenfield RL, Barnes RB, et al: Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. N Engl J Med 1992;327:157

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

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

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

63. Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, Strauss JF III, McAllister JM. The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 5925-33.

64. Wickenheisser JK, Quinn PG, Nelson VL, Legro RS, Strauss JF 3rd, McAllister JM. Differential activity of the cytochrome P450 17alpha-hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells. J Clin Endocrinol Metab 2000;85 :2304-11.

65. Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, Quinn PG, McAllister JM. Increased cytochrome P450 17alpha-hydroxylase promoter function in theca cells isolated from patients with polycystic ovary syndrome involves nuclear factor-1. Mol Endocrinol 2004; 18:588-605.

66. Wood JR, Ho CK, Nelson-Degrave VL, McAllister JM, Strauss JF 3rd. The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. J Reprod Immunol 2004; 63:51-60.

67. Legro RS, Spielman R, Urbanek M, Driscoll D, Strauss JF III and Dunaif A. Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome. Recent Prog Horm Res 1998; 53: 217-56.

68. Gharani N, Waterworth DM, Williamson R, Franks S. 5'polymorphism of the CYP17 gene is not associated with serum testosterone levels in women with polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 4174-80.

69. Gharani N, Waterworth D, Batty S, White D, Gilling-Smith C, Conway G, McCarthy, M, Franks S, Williamson R. Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. Hum Mol Genet 1997; 3: 397-402.

70. Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, Azziz R, Ehrmann DA, Norman RJ, Strauss JF 3rd, Spielman RS, Dunaif A. Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 8573-8.
71. SanMillan JL, Sancho J, Calvo RM, Escobar-Morreale HF. Role of the pentanucleotide (tttta)n polymorphism in the promoter of the CYP11a gene in the pathogenesis of hirsutism. Fertil Steril 2001; 75: 797-802.
72. Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, Hendricks KL, Legro RS, Strauss JF 3rd, McAllister JM. Retinoids and retinol differentially regulate steroid biosynthesis in ovarian theca cells isolated from normal cycling women and women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 4858-65.
73. Oksjoki S, Soderstrom M, Inki P, Vuorio E, Anttila L. Molecular profiling of polycystic ovaries for markers of cell invasion and matrix turnover. Fertil Steril 2005; 83: 937-44.
74. 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: 10619-23.
75. Pandey AV, Miller WL. Regulation of 17, 20 lyase activity by cytochrome b5 and by serine phosphorylation of P450c17. J Biol Chem 2005; 280: 13265-71.
76. Pandey AV, Mellon SH, Miller WL. Protein Phosphatase 2A and phosphoprotein SET regulate androgen production by P450c17. J Biol Chem 2003; 278; 2837-44.

77. Wood JR, Nelson VL, Ho C, Jansen E, Wang CY, Urbanek M, McAllister JM, Mosselman S, Strauss JF 3rd. The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis. J Biol Chem 2003; 278: 26380-90.

78. Akhtar MK, Kelly SL, Kaderbhai MA. Cytochrome b(5) modulation of 17{alpha} hydroxylase and 17-20 lyase (CYP17) activities in steroidogenesis. J Endocrinol 2005; 187: 267-74.

79. Hillier SG, Yong EL, Illingworth PJ, Baird DT, Schwall RH, Mason AJ. Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. Mol Cell Endocrinol 1991; 75: R1-R6.

80. Udoff LC and Adashi EY. Intraovarian regulation of ovarian androgen secretion in PCOS. In Azziz R, Nestler JE and Dewailly D (eds) Androgen Excess Disorders in Women Lippincott±Raven, Philadelphia, USA 1997, pp 295-301.

81. Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. Nature 2000; 404:411-4.

82. McConell LA, Leal MA, Vale WW. The distribution of betaglycan protein and mRNA in rat brain, pituitatry, and gonads: implications for a role for betaglycan in inhibin-mediated reproductive functions. Endocrinol 2002; 143: 1066-75.

83. Pigny P, Desailloud R, Cortet-Rudelli C, Duhamel A, Deroubaix-Allard D, Racadot A, Dewailly D. Serum a-inhibin levels in PCOS: relationship

to the serum androstenedione level. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 1939-43.

84. Pigny P, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Deroubaix D, Soudan B, Duhamel A, Dewailly D. Serum levels of inhibins are differentially altered in patients with PCOS: effects of being overweight and relevance to hyperandrogenism. Fertil Steril 2000; 73: 972-7.
85. Knight PG, Glister C. TGF-b superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction 2001; 121: 503-12.
86. Cook CL, Siow Y, Brenner AG, Fallat ME. Relationship between serum mullerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. Fertil Steril 2002; 77: 141-6.
87. Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated serum level of anti-mullerian hormone (AMH) in polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 5957-62.
88. Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee E, Nachtigal MW, Visser JA. Autocrine and paracrine MuÈllerian inhibiting substance hormone signalling in reproduction. Recent Prog Horm Res 2000; 55: 53-67.
89. Laurich VM, Trbovich AM, O'Neill FH, Houk CP, Sluss PM, Payne AH, Donahoe PK, Teixeira J. Mullerian inhibiting substance blocks the protein kinase A-induced expression of cytochrome P450 7alphahydroxylase/C (17±20) lyase mRNA in a mouse Leydig cell line

independent of cAMP responsive element binding protein phosphorylation. Endocrinology 2002; 143: 3351-60.

90. Solovyeva EV, Hayashi M, Margi K, Barkats C, Klein C, Amsterdam A, Hsueh AJ, Tsafriri A. Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. Biol Reprod 2002; 63: 1214-8.
91. Yamamoto N, Christenson LK, McAllister JM, Strauss JF III. Growth differentiation factor-9 inhibits 3¢5¢-adenosine monophosphatestimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 2849-56.
92. Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, Shimasaki S, Erickson GF. Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 1337-44.
93. Franks S. Anovulation in polycystic ovary syndrome. In: Diamanti-Kandarakis E, Nestler E, Panidis D, Pasquali R, eds. Insulin Resistance and Polycystic Ovarian Syndrome. New Jersey: Humana Press, 2007:297-302.
94. Diamanti-Kandarakis E, Kouli C, Alexandraki K, Spina G. Failure of mathematical indices to accurately assess insulin resistance in lean, overweight, or obese women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89: 1273-6.
95. Baillargeon JP, Carpentier A. Respective role of insulin and LH in the ovarian steroidogenic production of non-obese women with PCOS and

normal insulin levels-Final results Abstract [P1-565] presented in the 88th Annual Meeting of the Endocrine Society 2006, Boston, MA

96. 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: 175-83.

97. Spaczynski RZ, Arici A, Duleba AJ. Tumor necrosis factor-alpha stimulates proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. Biol Reprod 1999; 61: 993-8.

98. Kwintkiewicz J, Foyouzi N, Piotrowski P, Rzepczynska I, Duleba AJ. Mevastatin inhibits proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells by blocking the mitogen-activated protein kinase pathway. Fertil Steril 2006; 86 Suppl 4: 1053-8.

99. Sills ES, Drews CD, Perloe M, Tucker MJ, Kaplan CR, Palermo GD. Absence of profound hyperinsulinism in polycystic ovary syndrome is associated with subtle elevations in the plasminogen activator inhibitor system. Gynecol Endocrinol 2003; 17: 231-7.

100. Πανίδης Δ, Ρούσσος Δ. Νεότερες απόψεις για την παθογένεια του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών. Materia Medica Greca 1991; 19: 493-502.

101. Robinson JE, Birch RA, Foster DL, Padmanabhan V. Prenatal exposure of the ovine fetus to androgens sexually differentiates the steroid feedback mechanisms that control gonadotropin releasing

hormone secretion and disrupts ovarian cycles. Arch Sex Behav 2002; 31: 35-41.

102. Sarma HN, Manikkam M, Herkimer C, Dell'Orco J, Welch KB, Foster DL, Padmanabhan V. Fetal programming: excess prenatal testosterone reduces postnatal luteinizing hormone, but not follicle-stimulating hormone responsiveness, to estradiol negative feedback in the female. Endocrinology 2005; 146: 4281-91.

103. Unsworth WP, Taylor JA, Robinson JE. Prenatal programming of reproductive neuroendocrine function: the effect of prenatal androgens on the development of estrogen positive feedback and ovarian cycles in the ewe. Biol Reprod 2005; 72: 619-27.

104. Pielecka J, Moenter SM. Effect of steroid milieu on gonadotropin-releasing hormone-1 neuron firing pattern and luteinizing hormone levels in male mice. Biol Reprod 2006; 74: 931-7.

105. de Koning J, Lambalk CB, Helmerhorst FM, Helder MN. Is GnRH self-priming an obligatory feature of the reproductive cycle? Hum Reprod 2001; 16: 209-14.

106. Panidis D, Farmakiotis D, Rousso D, Katsikis I, Kourtis A, Diamanti-Kandarakis E. Serum luteinizing hormone levels are markedly increased and significantly correlated with Delta 4-androstendione levels in lean women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2005; 84: 538-40.

107. Fowler PA, Sorsa-Leslie T, Harris W, Mason HD. Ovarian gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF): where are we after 20 years of research? Reproduction 2003; 126: 689-99.

108. Rosenfield RL. Ovarian and adrenal function in polycystic ovary syndrome. Endocrinol Metab Clin North Am 1999; 28: 265-93.

109. Ibanez L, Hall J, Potau N, et al: Ovarian 17-hydroxyprogesterone hyperresponsive-ness to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist challenge in women with polycystic ovary syndrome is not mediated by luteinizing hormone hypersecretion: Evidence from GnRH agonist and human chorionic gonadotropin stimulation testing. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:4103

110. Rosenfield RL: Is polycystic ovary syndrome a neuroendocrine or an ovarian disorder? Clin Endocrinol 1997;47:423

111. Fauser B, Pache T, Lamberts S, et al: Serum bioactive and immunoreactive luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels in women with cycle abnormalities, with or without polycystic ovarian disease. J Clin Endocrinol Metab 199173:811

112. Taylor A, McCourt B, Martin K, et al: Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:2248

113. Lachelin G, Barnett M, Hopper B, et al: Adrenal function in normal women and in primate granulosa cells. J Clin Endocrinol Metab 1992;*75:*155

114. Ehrmann DA, Rosenfield RL, Barnes RB, et al: Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. N Engl J Med 1992;327:157

115. Gonzalez F, Chang L, Horab T, et al: Evidence for heterogeneous etiologies of adrenal dysfunction in polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 1996;66:354

116. Rodin A, Thakkar H, Taylor N, et al: Hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome: Evidence of dysregulation of ĺíβ-hydroxysteroid dehydrogenase. N Engl J Med 1994;330:460

117. Crave T-C, Fimbel S, Lejeune H, et al: Effects of diet and metformin administration on sex hormone-binding globulin, androgens, and insulin in hirsute and obese women. J Clin Endocrinol Metab 1995;80:2057

118. Jakubowicz D, Nestler J: 17a-Hydroxyprogesterone responses to leuprolide and serum androgens in obese women with and without polycystic ovary syndrome after dietary weight loss. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:556

119. H. E. Cooper,W. N. Spellacy, K. A. Prem, and W. D. Cohen, “Hereditary factors in the Stein-Leventhal syndrome,” American Journal of Obstetrics and Gynecology, vol. 100, no. 3, pp. 371–387, 1968

120. S. Franks, N. Gharani, D. Waterworth, et al., “The genetic basis of polycystic ovary syndrome,” Human Reproduction, vol. 12, no. 12, pp. 2641–2648, 1997.

121. S. Jahanfar and J. A. Eden, “Genetic and non-genetic theories

on the etiology of polycystic ovary syndrome," Gynecological Endocrinology, vol. 10, no. 5, pp. 357–364, 1996.

122. D. Ferriman and A. W. Purdie, "The inheritance of polycystic ovarian disease and a possible relationship to premature balding," Clinical Endocrinology, vol. 11, no. 3, pp. 291–300, 1979.

123. O. Lunde, P. Magnus, L. Sandvik, and S. Hoglo, "Familial clustering in the polycystic ovarian syndrome," Gynecologic and Obstetric Investigation, vol. 28, no. 1, pp. 23–30, 1989.

124. W. M. Hague, J. Adams, S. T. Reeders, T. E. A. Peto, and H. S. Jacobs, "Familial polycystic ovaries: a genetic disease?" Clinical Endocrinology, vol. 29, no. 6, pp. 593–605, 1988.

125. A. H. Carey, K. L. Chan, F. Short, D. White, R. Williamson, and S. Franks, "Evidence for a single gene effect causing polycystic ovaries and male pattern baldness," Clinical Endocrinology, vol. 38, no. 6, pp. 653–658, 1993.

126. R. S. Legro, D. Driscoll, J. F. Strauss III, J. Fox, and A. Dunaif, "Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, no. 25, pp. 14956–14960, 1998.

127. M. D. Kahsar-Miller, C. Nixon, L. R. Boots, R. C. Go, and R. Azziz, "Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS," Fertility and Sterility, vol. 75, no. 1, pp. 53–58, 2001.

128. A. Govind, M. S. Obhrai, and R. N. Clayton, "Polycystic

ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families,Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 84, no. 1, pp. 38–43, 1999.

129. J. R. Givens, “Familial polycystic ovarian disease,” Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, vol. 17, no. 4, pp. 771–783, 1988.

130. B. O. Yildiz, H. Yarali, H. Oguz, and M. Bayraktar, “Glucose intolerance, insulin resistance, and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 88, no. 5, pp. 2031–2036, 2003.

131. R. J. Norman, S. Masters, and W. Hague, “Hyperinsulinemia is common in family members of women with polycystic ovary syndrome,” Fertility and Sterility, vol. 66, no. 6, pp. 942–947, 1996.

132. R. S. Legro, R. Bentley-Lewis, D. Driscoll, S. C. Wang, and A. Dunaif, “Insulin resistance in the sisters of women with polycystic ovary syndrome: association with hyperandrogenemia rather than menstrual irregularity,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 87, no. 5, pp. 2128–2133, 2002.

133. R. S. Legro, A. R. Kunselman, L. Demers, S. C. Wang, R. Bentley-Lewis, and A. Dunaif, “Elevated dehydroepiandrosterone sulfate levels as the reproductive phenotype in the brothers of women with polycystic ovary syndrome,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 87, no. 5, pp. 2134–2138, 2002.

134. L. J. Palmer and L. R. Cardon, “Shaking the tree: mapping complex disease genes with linkage disequilibrium,” Lancet, vol. 366, no. 9492, pp. 1223–1234, 2005

135. N. Gharani, D. M.Waterworth, S. Batty, et al., “Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism,” Human Molecular Genetics, vol. 6, no. 3, pp. 397–402, 1997.

136. E. Diamanti-Kandarakis, M. I. Bartzis, A. T. Bergiele, T. C. Tsianateli, and C. R. Kouli, “Microsatellite polymorphism (tttta)n at -528 base pairs of gene CYP11α influences hyperandrogenemia in patients with polycystic ovary syndrome,” Fertility and Sterility, vol. 73, no. 4, pp. 735–741, 2000.

137. Y.Wang, X.-K.Wu, Y.-X. Cao, et al., “Microsatellite polymorphism of (tttta)n in the promoter of CYP11a gene in Chinese women with polycystic ovary syndrome,” Zhonghua Yi Xue Za Zhi, vol. 85, no. 48, pp. 3396–3400, 2005.

138. M. Gaasenbeek, B. L. Powell, U. Sovio, et al., “Large-scale analysis of the relationship between CYP11A promoter variation, polycystic ovarian syndrome, and serum testosterone,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 89, no. 5, pp. 2408–2413, 2004.

139. L. Tan and G. Zhu, “Relationship between the microsatellite polymorphism of CYP11α gene and the pathogenesis of hyperandrogenism of polycystic ovary syndrome in Chinese,” Chinese Journal of Medical Genetics, vol. 22, no. 2, pp. 216–218, 2005.

140. L. Tan and G. Zhu, “Role of the pentanucleotide (tttta)n polymorphisms of Cyp11alpha gene in the pathogenesis of hyperandrogenism in Chinese women with polycystic ovary syndrome,” Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences, vol. 25, no. 2, pp. 212–214, 2005.

141. M. Urbanek, R. S. Legro, D. A. Driscoll, et al., “Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin,” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, no. 15, pp. 8573–8578, 1999.

142. J. L. San Mill´an, J. Sancho, R. M. Calvo, and H. F. Escobar-Morreale, “Role of the pentanucleotide (tttta)n polymorphism in the promoter of the CYP11a gene in the pathogenesis of hirsutism,” Fertility and Sterility, vol. 75, no. 4, pp. 797–802, 2001.

143. R. L. Rosenfield, R. B. Barnes, and D. A. Ehrmann, “Studies of the nature of 17-hydroxyprogesterone hyperresponsiveness to gonadotropin-releasing hormone agonist challenge in functional ovarian hyperandrogenism,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 79, no. 6, pp. 1686–1692, 1994.

144. S. F. Witchel and C. E. Aston, “The role of heterozygosity for CYP21 in the polycystic ovary syndrome,” Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, vol. 13, supplement 5, pp. 1315–1317, 2000.

145. S. F.Witchel, P. A. Lee, M. Suda-Hartman, and E. P.Hoffman,

"Hyperandrogenism and manifesting heterozygotes for 21-hydroxylase deficiency," Biochemical andMolecularMedicine, vol. 62, no. 2, pp. 151–158, 1997.

146. H. F. Escobar-Morreale, J. L. San Mill´an, R. R. Smith, J. Sancho, and S. F. Witchel, "The presence of the 21-hydroxylase deficiency carrier status in hirsute women: phenotypegenotype correlations," Fertility and Sterility, vol. 72, no. 4, pp. 629–638, 1999.

147. D. Glintborg, A. P. Hermann, K. Brusgaard, J. Hangaard, C. Hagen, and M. Andersen, "Significantly higher adrenocorticotropin-stimulated cortisol and 17-hydroxyprogesterone levels in 337 consecutive, premenopausal, caucasian, hirsute patients compared with healthy controls," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 90, no. 3, pp. 1347–1353, 2005.

148. S. F. Witchel, M. Kahsar-Miller, C. E. Aston, C. White, and R. Azziz, "Prevalence of CYP21 mutations and IRS1 variant among women with polycystic ovary syndrome and adrenal androgen excess," Fertility and Sterility, vol. 83, no. 2, pp. 371–375, 2005.

149. J. K. Wickenheisser, P. G. Quinn, V. L. Nelson, R. S. Legro, J. F. Strauss III, and J.M.McAllister, "Differential activity of the cytochrome P450 17α-hydroxylase and steroidogenic acute Mregulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 85, no. 6, pp. 2304–2311, 2000.

150. J. K.Wickenheisser, V. L. Nelson-Degrave, P. G. Quinn, and J.

M.McAllister, “Increased cytochrorne P450 17α-hydroxylase promoter function in theca cells isolated from patients with polycystic ovary syndrome involves nuclear factor-1,” Molecular Endocrinology, vol. 18, no. 3, pp. 588–605, 2004.

151. L. Sharp, A. H. Cardy, S. C. Cotton, and J. Little, “CYP17 gene polymorphisms: prevalence and associations with hormone levels and related factors. A HuGE review,” American Journal of Epidemiology, vol. 160, no. 8, pp. 729–740, 2004.

152. R. L. Rosenfield, R. B. Barnes, J. F. Cara, and A. W. Lucky, “Dysregulation of cytochrome P450c 17α as the cause of polycystic ovarian syndrome,” Fertility and Sterility, vol. 53, no. 5, pp. 785–791, 1990.

153. H. Escobar-Morreale, F. Pazos, N. Potau, R. Garcia-Robles, J. M. Sancho, and C. Varela, “Ovarian suppression with triptorelin and adrenal stimulation with adrenocorticotropin in functional hyperadrogenism: role of adrenal and ovarian cytochrome P450c17α,” Fertility and Sterility, vol. 62, no. 3, pp. 521–530, 1994.

154. J. K. Wickenheisser, V. L. Nelson-DeGrave, and J. M. McAllister,“Dysregulation of cytochrome P450 17α-hydroxylase messenger ribonucleic acid stability in theca cells isolated from women with polycystic ovary syndrome,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 90, no. 3, pp. 1720–1727, 2005.

155. A. H. Carey, D. Waterworth, K. Patel, et. al., “Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of

the steroid metabolism gene CYP17", Human Molecular Genetics, vol. 3, no. 10, pp. 1873-1876, 1994.

156. E. Diamanti-Kandarakis, M. I. Bartzis, E. D. Zapanti, et al., "Polymorphism T → C (-34 bp) of gene CYP17 promoter in Greek patients with polycystic ovary syndrome," Fertility and Sterility, vol. 71, no. 3, pp. 431–435, 1999.

157. N. Gharani, D. M.Waterworth, R.Williamson, and S. Franks, "5_ polymorphism of the CYP17 gene is not associated with serum testosterone levels in women with polycystic ovaries," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 81, no. 11, p. 4174, 1996.

158. K. Techatraisak, G. S. Conway, and G. Rumsby, "Frequency of a polymorphism in the regulatory region of the 17α-hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) gene in hyperandrogenic states," Clinical Endocrinology, vol. 46, no. 2, pp. 131–134, 1997.

159. S. F.Witchel, P. A. Lee, M. Suda-Hartman, R. Smith, and E. P. Hoffman, "17α-hydroxylase/17,20-lyase dysregulation is not caused bymutations in the coding regions of CYP17," Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology, vol. 11, no. 3, pp. 133–137, 1998.

160. L.-H. Zhang, H. Rodriguez, S. Ohno, and W. L. Miller, "Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, no. 23, pp. 10619–10623, 1995.

161. K.-N.Qin and R. L. Rosenfield, "Role of cytochrome P450c17 in polycystic ovary syndrome," Molecular and Cellular Endocrinology,

vol. 145, no. 1-2, pp. 111–121, 1998.

162. S. Takayama, M. F. White, and C. R. Kahn, “Phorbol esterinduced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity,” Journal of Biological Chemistry, vol. 263, no. 7, pp. 3440–3447, 1988.

163. A. Dunaif, J. Xia, C.-B. Book, E. Schenker, and Z. Tang, “Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome,” Journal of Clinical Investigation, vol. 96, no. 2, pp. 801–810, 1995.

164. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. Endocr Rev. 1997 Dec;18(6):774-800.

165. E. R. Simpson, M. S. Mahendroo, G. D. Means, et al., “Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis,” Endocrine Reviews, vol. 15, no. 3, pp. 342–355, 1994.

166. D.W. Nebert,M. Adesnik,M. J. Coon, et al., “The P450 gene superfamily: recommended nomenclature,” DNA, vol. 6, no. 1, pp. 1–11, 1987.

167. S. Chen, M. J. Besman, R. S. Sparkes, et al., “Human aromatase: cDNA cloning, Southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15,” DNA, vol. 7, no. 1, pp. 27–38, 1988.

168. N. Harada, H. Ogawa, M. Shozu, and K. Yamada, “Genetic studies to characterize the origin of the mutation in placental

aromatase deficiency," American Journal of Human Genetics, vol. 51, no. 3, pp. 666–672, 1992.

169. K. Takayama, T. Fukaya, H. Sasano, et al., "Immunohistochemical study of steroidogenesis and cell proliferation in polycystic ovarian syndrome," Human Reproduction, vol. 11, no. 7, pp. 1387–1392, 1996.

170. G. F. Erickson, A. J. W. Hsueh, M. E. Quigley, R.W. Rebar, and S. S. Yen, "Functional studies of aromatase activity in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 49, no. 4, pp. 514–519, 1979.

171. A. J. Jakimiuk, S. R. Weitsman, P. R. Brzechffa, and D. A. Magoffin, "Aromatase mRNA expression in individual follicles from polycystic ovaries,"MolecularHuman Reproduction, vol. 4, no. 1, pp. 1–8, 1998.

172. D. Soderlund, P. Canto, S. Carranza-Lira, and J. P. M´endez, "No evidence of mutations in the P450 aromatase gene in patients with polycystic ovary syndrome," Human Reproduction, vol. 20, no. 4, pp. 965–969, 2005.

173. C. J. Petry, K. K. Ong, K. F. Michelmore, et al., "Association of aromatase (CYP 19) gene variation with features of hyperandrogenism in two populations of young women," Human Reproduction, vol. 20, no. 7, pp. 1837–1843, 2005.

174. Qin K, Ehrmann DA, Cox N, Refetoff S, Rosenfield RL Identification of a functional polymorphism of the human type 5 17β-

hydroxysteroid dehydrogenase gene associated with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(1):270-278.

175. Goodarzi MO,.Jones MR, Antoine HJ, Pall M, Chen YI, Azziz R Non-replication of the type 5 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase gene association with polycystic ovary syndrome J Clin Endocrin Metab. 2008; 93(1):300-303.

176. Petry CJ, Ong KK, Wingate DL, Zegher F,Ibanez L, Dunger DB Lack of association between common polymorphisms in the 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type V gene (HSD17B5) and precocious pubarche. J Ster Biochem & Mol Biol 2007; 105:176-180.

177. Association of the 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (L71A/G HSD17B5 SNP) with hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome (PCOS) Dimitra J. Marioli, Alexandros D. Saltamavros, Vasiliki Vervita, Vasiliki Koika, Ph.D.,a,b George Adonakis, George Decavalas, Kostas B. Markou, and Neoklis A. Georgopoulos. Fertil Steril (accepted) 2008

178. D. B. Lubahn, D. R. Joseph, P.M. Sullivan, H. F.Willard, F. S.French, and E. M. Wilson, “Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromomose,” Science, vol. 240, no. 4850, pp. 327–330, 1988.

179. M. A. Carson-Jurica, W. T. Schrader, and B. W. O’Malley, “Steroid receptor family: structure and functions,” Endocrine Reviews, vol. 11, no. 2, pp. 201–220, 1990.

180. N. L. Chamberlain, E. D. Driver, and R. L. Miesfeld, “The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-

terminal domain affect transactivation function," Nucleic Acids Research, vol. 22, no. 15, pp. 3181– 3186, 1994.

181. E. Giovannucci, M. J. Stampfer, K. Krithivas, et al., "The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, no. 7, pp. 3320–3323, 1997.

182. T. G. Tut, F. J. Ghadessy, M. A. Trifiro, L. Pinsky, and E.L. Yong, "Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 82, no. 11, pp. 3777–3782, 1997.

183. A. T. Dowsing, E. L. Yong, M. Clark, R. I. McLachlan, D. M. De Kretser, and A. O. Trounson, "Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgenreceptor gene," Lancet, vol. 354, no. 9179, pp. 640–643, 1999.

184. T. R. Rebbeck, P. W. Kantoff, K. Krithivas, et al., "Modification of BRCA1-associated breast cancer risk by the polymorphic androgen receptor CAG repeat," American Journal of Human Genetics, vol. 64, no. 5, pp. 1371–1377, 1999.

185. A. Mifsud, S. Ramirez, and E. L. Yong, "Androgen receptor gene CAG trinucleotide repeats in anovulatory infertility and polycystic ovaries," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 85, no. 9, pp. 3484–3488, 2000.

186. T. Hickey, A. Chandy, and R. J. Norman, "The androgen receptor CAG repeat polymorphism and X-chromosome inactivation in

Australian Caucasian women with infertility related to polycystic ovary syndrome," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 87, no. 1, pp. 161–165, 2002.

187. J. Jaaskelainen, S. Korhonen, R. Voutilainen, M. Hippel¨ainen, and S. Heinonen, "Androgen receptor gene CAG length polymorphism in women with polycystic ovary syndrome," Fertility and Sterility, vol. 83, no. 6, pp. 1724–1728, 2005.

188. M. Pugeat, J. C. Crave, J. Tourniaire, andM. G. Forest, "Clinical utility of sex hormone-binding globulin measurement," Hormone Research, vol. 45, no. 3–5, pp. 148–155, 1996.

189. C. Selby, "Sex hormone binding globulin: origin, function and clinical significance," Annals of Clinical Biochemistry, vol. 27, part 6, pp. 532–541, 1990.

190. D. Berube, G. E. Seralini, R. Gagne, and G. L. Hammond, "Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12→p13)," Cytogenetics and Cell Genetics, vol. 54, no. 1-2, pp. 65–67, 1990.

191. K. N. Hogeveen, M. Talikka, and G. L. Hammond, "Human sex hormone-binding globulin promoter activity is influenced by a (TAAAA)n repeat element within an Alu sequence," Journal of Biological Chemistry, vol. 276, no. 39, pp. 36383–36390, 2001.

192. N. Xita, A. Tsatsoulis, A. Chatzikyriakidou, and I. Georgiou, "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," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 88, no. 12, pp. 5976–5980, 2003.

193. A. H. Balen, "Hypersecretion of luteinizing hormone and the polycystic ovary syndrome," Human Reproduction, vol. 8, supplement 2, pp. 123–128, 1993.

194. J. E.Hall, A. E. Taylor,K.A.Martin, andW. F. Crowley, "New approaches to the study of the neuroendocrine abnormalities of women with the polycystic ovarian syndrome," Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 687, pp. 182–192, 1993.

195. K. Furui, N. Suganuma, S.-I. Tsukahara, et al., "Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) β-subunit, associated with immunologically anomalous LH variants," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 78, no. 1, pp. 107–113, 1994.

196. C. Nilsson, K. Pettersson, R. P. Millar, K. A. Coerver, M. M. Matzuk, and I. T. Huhtaniemi, "Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research," Fertility and Sterility, vol. 67, no. 6, pp. 998–1004, 1997.

197. K. Okuda, T. Yamada, H. Imoto, H. Komatsubara, and O. Sugimoto, "Antigenic alteration of an anomalous human luteinizing hormone caused by two chorionic gonadotropin type amino-acid substitutions," Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 200, no. 1, pp. 584–590, 1994.

198. A.-M. Haavisto, K. Pettersson, M. Bergendahl, A. Virkamaki, and I. Huhtaniemi, "Occurrence and biological properties of a common

genetic variant of luteinizing hormone," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 80, no. 4, pp. 1257–1263, 1995.

199. M. Rajkhowa, J. A. Talbot, P.W. Jones, et al., "Prevalence of an immunological LH β-subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome," Clinical Endocrinology, vol. 43, no. 3, pp. 297–303, 1995.

200. J. S. Tapanainen, R. Koivunen, B. C. J. M. Fauser, et al., "A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 84, no. 5, pp. 1711–1715, 1999.

201. L. N. Ramanujam, W. X. Liao, A. C. Roy, A. Loganath, H. H. Goh, and S. C. Ng, "Association of molecular variants of luteinizing hormone with menstrual disorders," Clinical Endocrinology, vol. 51, no. 2, pp. 243–246, 1999.

202. K. Elter, C. T. Erel, N. Cine, U. Ozbek, B. Hacihanefioglu, and E. Ertungealp, "Role of the mutations Trp8 → Arg and alelle15→ Thr of the human luteinizing hormone β-subunit in women with polycystic ovary syndrome," Fertility and Sterility, vol. 71, no. 3, pp. 425–430, 1999.

203. A. C. Roy, W.-X. Liao, Y. Chen, S. Arulkumaran, and S. S. Ratnam, "Identification of seven novel mutations in LHβ-subunit gene by SSCP," Molecular and Cellular Biochemistry, vol. 165, no. 2, pp. 151–153, 1996.

204. K. Takahashi, K. Karino, H. Kanasaki, et al., "Influence of missense mutation and silent mutation of LHβ-subunit gene in

Japanese patients with ovulatory disorders," European Journal of Human Genetics, vol. 11, no. 5, pp. 402–408, 2003.

205. S. Franks, N. Gharani, and M. McCarthy, "Candidate genes in polycystic ovary syndrome," Human Reproduction Update, vol. 7, no. 4, pp. 405–410, 2001.

206. P. G. Knight and C. Glister, "Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary," Reproduction, vol. 121, no. 4, pp. 503–512, 2001.

207. Q. Guo, T. R. Kumar, T. Woodruff, L. A. Hadsell, F. J. De-Mayo, and M. M. Matzuk, "Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice," Molecular Endocrinology, vol. 12, no. 1, pp. 96–106, 1998.

208. J. P. Mather, A. Moore, and R.-H. Li, "Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators," Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 215, no. 3, pp. 209–222, 1997.

209. H. Shibata, M. Kanzaki, T. Takeuchi, J.-I. Miyazaki, and I. Kojima, "Two distinct signaling pathways activated by activin a in glucose-responsive pancreatic β-cell lines," Journal of Molecular Endocrinology, vol. 16, no. 3, pp. 249–258, 1996.

210. R. S. Legro, R. Spielman,M. Urbanek, D. Driscoll, J. F. Strauss III, and A. Dunaif, "Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome," Recent Progress in Hormone Research, vol. 53, pp. 217–256, 1998.

211. M. Urbanek, X. Wu, K. R. Vickery, et al., “Allelic variants of the follistatin gene in polycystic ovary syndrome,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 85, no. 12, pp. 4455–4461, 2000.

212. W. X. Liao, A. C. Roy, and S. C. Ng, “Preliminary investigation of follistatin gene mutations in women with polycystic ovary syndrome,” Molecular Human Reproduction, vol. 6, no. 7, pp. 587–590, 2000.

213. R. M. Calvo, G. Villuendas, J. Sancho, J. L. San Mill´an, and H. F. Escobar-Morreale, “Role of the follistatin gene in women with polycystic ovary syndrome,” Fertility and Sterility, vol. 75, no. 5, pp. 1020–1023, 2001.

214. A. Dunaif, K. R. Segal, W. Futterweit, and A. Dobrjansky, “Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome,” Diabetes, vol. 38, no. 9, pp. 1165–1174, 1989.

215. C. Junien and V. van Heyningen, “Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 11,” Cytogenetics and Cell Genetics, vol. 55, no. 1–4, pp. 153–169, 1990.

216. G. C. Kennedy, M. S. German, and W. J. Rutter, “The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription,” Nature Genetics, vol. 9, no. 3, pp. 293–298, 1995.

217. J. Paquette, N. Giannoukakis, C. Polychronakos, P. Vafiadis, and C. Deal, “The INS 5_ variable number of tandem repeats is associated with IGF2 expression in humans,” Journal of Biological Chemistry, vol. 273, no. 23, pp. 14158–14164, 1998.

218. G. I. Bell, M. J. Selby, and W. J. Rutter, “The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences,” Nature, vol. 295, no. 5844, pp. 31–35, 1982.

219. J. U. Weaver, P. G. Kopelman, and G. A. Hitman, “Central obesity and hyperinsulinaemia in women are associated with polymorphism in the 5_ flanking region of the human insulin gene,” European Journal of Clinical Investigation, vol. 22, no. 4, pp. 265–270, 1992.

220. K. K. L. Ong, D. I. Phillips, C. Fall, et al., “The insulin gene VNTR, type 2 diabetes and birth weight,” Nature Genetics, vol. 21, no. 3, pp. 262–263, 1999.

221. A. Dunaif, K. R. Segal, D. R. Shelley, G. Green, A. Dobrjansky, and T. Licholai, “Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome,” Diabetes, vol. 41, no. 10, pp. 1257–1266, 1992.

222. J. Holte, T. Bergh, C. Berne, L. Wide, and H. Lithell, “Restored insulin sensitivity but persistently increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 80, no. 9, pp. 2586–2593, 1995.

223. N. M. O’Meara, J. D. Blackman, D. A. Ehrmann, et al., “Defects in β-cell function in functional ovarian hyperandrogenism,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 76, no. 5, pp. 1241–1247, 1993.

224. D. M. Waterworth, S. T. Bennett, N. Gharani, et al., “Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome,” Lancet, vol. 349, no. 9057, pp. 986–990, 1997.

225. R. M. Calvo, D. Teller´ıa, J. Sancho, J. L. San Mill´an, and H.F. Escobar-Morreale, “Insulin gene variable number of tandem repeats regulatory polymorphism is not associated with hyperandrogenism in Spanish women,” Fertility and Sterility, vol. 77, no. 4, pp. 666–668, 2002.

226. I. D. Goldfine, “The insulin receptor: molecular biology and transmembrane signaling,” Endocrine Reviews, vol. 8, no. 3, pp. 235–255, 1987.

227. L. R. Sorbara, Z. Tang, A. Cama, et al., “Absence of insulin receptor gene mutations in three insulin-resistant women with the polycystic ovary syndrome,” Metabolism, vol. 43, no. 12, pp. 1568–1574, 1994.

228. J. A. Talbot, E. J. Bicknell, M. Rajkhowa, A. Krook, S. O’Rahilly, and R. N. Clayton, “Molecular scanning of theinsulin receptor gene in women with polycystic ovarian syndrome,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 81, no. 5, pp. 1979–1983, 1996.

229. M. Urbanek, A. Woodroffe, K. G. Ewens, et al., “Candidate gene region for polycystic ovary syndrome on chromosome 19p13.2,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 90, no. 12, pp. 6623–6629, 2005.

230. S. Siegel, W. Futterweit, T. F. Davies, et al., “A C/T single nucleotide polymorphism at the tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is associated with polycystic ovary syndrome,” Fertility and Sterility, vol. 78, no. 6, pp. 1240–1243, 2002.

231. S. R.Hubbard, L.Wei, L. Ellis, andW. A.Hendrickson, “Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor,” Nature, vol. 372, no. 6508, pp. 746–754, 1994.

232. M. F. White, “IRS proteins and the common path to diabetes,” American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, vol. 283, no. 3, pp. E413–E422, 2002.

233. D. J. Burks and M. F.White, “IRS proteins and beta-cell function,” Diabetes, vol. 50, supplement 1, pp. S140–S145, 2001.

234. A. Jellema, M. P. A. Zeegers, E. J. M. Feskens, P. C. Dagnelie, and R. P.Mensink, “Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate-1 gene and association with type 2 diabetes: a metaanalysis of 27 studies,” Diabetologia, vol. 46, no. 7, pp. 990–995, 2003.

235. T. Sir-Petermann, F. P´erez-Bravo, B. Angel, M. Maliqueo,M. Calvillan, and A. Palomino, “G972R polymorphism of IRS-1 in women with polycystic ovary syndrome,” Diabetologia, vol. 44, no. 9, pp. 1200–1201, 2001.

236. S. A. El Mkadem, C. Lautier, F. Macari, et al., “Role of allelic variants Gly972Arg of IRS-1 and Gly1057Asp of IRS-2 in moderate-to-severe insulin resistance of women with polycystic ovary syndrome,” Diabetes, vol. 50, no. 9, pp. 2164–2168, 2001.

237. N. F.Wiernsperger and C. J. Bailey, “The antihyperglycaemic effect of metformin therapeutic and cellular mechanisms,” Drugs, vol. 58, supplement 1, pp. 31–39, 1999, discussion 75–82.

238. S. K. Sreenan, Y.-P. Zhou, K. Otani, et al., “Calpains play a role in insulin secretion and action,” Diabetes, vol. 50, no. 9, pp. 2013–2020, 2001.

239. Y. Horikawa, N. Oda, N. J. Cox, et al., “Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus,” Nature Genetics, vol. 26, no. 2, pp. 163–175, 2000.

240. A. Gonzalez, E. Abril, A. Roca, et al., “Comment: CAPN10 alleles are associated with polycystic ovary syndrome,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 87, no. 8, pp. 3971–3976, 2002.

241. A. Gonzalez, E. Abril, A. Roca, et al., “Specific CAPN10 gene haplotypes influence the clinical profile of polycystic ovary patients,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 88, no. 11, pp. 5529–5536, 2003.

242. L. Haddad, J. C. Evans, N. Gharani, et al., “Variation within the type 2 diabetes susceptibility gene calpain-10 and polycystic ovary syndrome,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 87, no. 6, pp. 2606–2610, 2002.

243. E. E. Kershaw and J. S. Flier, “Adipose tissue as an endocrine organ,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 89, no. 6, pp. 2548–2556, 2004.

244. L. Oksanen, A. Tiitinen, J. Kaprio, H. A. Koistinen, S.-L. Karonen, and K. Kontula, “No evidence for mutations of the leptin or leptin receptor genes in women with polycystic ovary syndrome,” Molecular Human Reproduction, vol. 6, no. 10, pp. 873–876, 2000.

245. F. B. Hu, A. Doria, T. Li, et al., “Genetic variation at the adiponectin locus and risk of type 2 diabetes in women,” Diabetes, vol. 53, no. 1, pp. 209–213, 2004.

246. K. Hara, P. Boutin, Y. Mori, et al., “Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population,” Diabetes, vol. 51, no. 2, pp. 536–540, 2002.

247. M. Stumvoll, O. Tschritter, A. Fritsche, et al., “Association of the T-G polymorphism in adiponectin (Exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes,” Diabetes, vol. 51, no. 1, pp. 37–41, 2002.

248. C. Menzaghi, T. Ercolino, R. Di Paola, et al., “A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome,” Diabetes, vol. 51, no. 7, pp. 2306–2312, 2002.

249. J. L. San Millan, M. Corton, G. Villuendas, J. Sancho, B. Peral, and H. F. Escobar-Morreale, “Association of the polycystic ovary syndrome with genomic variants related to insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and obesity,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 89, no. 6, pp. 2640–2646, 2004.

250. S. M. Rangwala and M. A. Lazar, “Peroxisome proliferator activated receptor γ in diabetes and metabolism,” Trends in Pharmacological Sciences, vol. 25, no. 6, pp. 331–336, 2004.

251. A. Elbrecht, Y. Chen, C. A. Cullinan, et al., “Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors γ1 and γ2,” Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 224, no. 2, pp. 431–437, 1996.

252. A. J. Vidal-Puig, R. V. Considine, M. Jimenez-Li˜nan, et al., “Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues: effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids,” Journal of Clinical Investigation, vol. 99, no. 10, pp. 2416–2422, 1997.

253. P. Tontonoz, E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari, and B. M. Spiegelman, “mPPARγ2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer,” Genes and Development, vol. 8, no. 10, pp. 1224–1234, 1994.

254. D. Altshuler, J. N. Hirschhorn, M. Klannemark, et al., “The common PPARγ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes,” Nature Genetics, vol. 26, no. 1, pp. 76–80, 2000.

255. A. Meirhaeghe and P. Amouyel, “Impact of genetic variation of PPARγ in humans,” Molecular Genetics and Metabolism, vol. 83, no. 1-2, pp. 93–102, 2004.

256. M. Hara, S. Y. Alcoser, A. Qaadir, K. K. Beiswenger, N. J. Cox, and D. A. Ehrmann, “Insulin resistance is attenuated in women with

polycystic ovary syndrome with the Pro12Ala polymorphism in the pparγ gene," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 87, no. 2, pp. 772–775, 2002.

257. S. Hahn, A. Fingerhut, U. Khomtsiv, et al., "The peroxisome proliferator activated receptor gamma Pro12Ala polymorphism is associated with a lower hirsutism score and increased insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome," Clinical Endocrinology, vol. 62, no. 5, pp. 573–579, 2005.

258. Lane DE. Polycystic ovary syndrome and its differential diagnosis. Obstet Gynecol Surv 2006;61:125-35

259. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. JAMA. 2002 Jan 16;287(3):356-9.

260. Carmina E, Koyama T, Chang L, Stanczyk FZ, Lobo RA. Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? Am J Obstet Gynecol. 1992 Dec;167(6):1807-12.

261. Wild AR : Hyperandrogenism: implications for cardiovascular endometrial and breast disease in Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, editors: Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology, Lippincot-Raven pp 1617-1634, 1995

262. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. Endocr Rev. 1997 Dec;18(6):774-800.

263. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. Diabetes. 1989 Sep;38(9):1165-74

264. Dunaif A. Insulin action in the polycystic ovary syndrome. Endocrinol Metab Clin North Am. 1999 Jun;28(2):341-59.

265. Li M, Youngren JF, Dunaif A, Goldfine ID, Maddux BA, Zhang BB, Evans JL. Decreased insulin receptor (IR) autophosphorylation in fibroblasts from patients with PCOS: effects of serine kinase inhibitors and IR activators. J Clin Endocrinol Metab. 2002 Sep;87(9):4088-93.

266. Book CB, Dunaif A. Selective insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 1999 Sep;84(9):3110-6.

267. 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 Jun;83(6):2001-5.

268. Moghetti P, Castello R, Negri C, Tosi F, Spiazzi GG, Brun E, Balducci R, Toscano V, Muggeo M. Insulin infusion amplifies 17 alpha-hydroxycorticosteroid intermediates response to adrenocorticotropin in hyperandrogenic women: apparent relative impairment of 17,20-lyase activity. J Clin Endocrinol Metab. 1996 Mar;81(3):881-6.

269. Ek I, Arner P, Rydén M, Holm C, Thörne A, Hoffstedt J, Wahrenberg H. A unique defect in the regulation of visceral fat cell lipolysis in the polycystic ovary syndrome as an early link to insulin resistance. Diabetes. 2002 Feb;51(2):484-92.

270. Reiling BA, Drackley JK, Grum LR, Berger LL. Effects of prenatal androgenization and lactation on adipose tissue metabolism in finishing single-calf heifers. J Anim Sci. 1997 Jun;75(6):1504-13.

271. Maitra A, Pingle RR, Menon PS, Naik V, Gokral JS, Meherji PK. Dyslipidemia with particular regard to apolipoprotein profile in association with polycystic ovary syndrome: A study among Indian women. Int J Fertil Womens Med 2001;46:271-7

272. Pierpoint T, Mckeigue PM, Isaacr AJ, Wilt SH, Jacobs HS. Mortality of women with PCOS at long term follow-up. J Clin Epidemiol 1998;51:581-6

273. Conway SG, Agarwal R, Betteridge DJ, Jacobs HS. Risk factors for coronary artery disease in lean and obese women with the polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol 1992;37:119-125

274. Dahlgren E, Johansson S, Lindstendt G,Knutsson F, Oden A, Janson PO, et al. Women with PCOS wedge resected in 1956 to 1965: A long-term follow-up focusing on natural history and circulating hormones. Fertile Steril 1992;57:505-13

275. Mathews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assesment : insulin resistance and B cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 1985:28:412-419.

276. Carmina E, Lobo RA. Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril. 2004;82(3):661-665.

277. Tai MM. A Mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. Diabetes Care 1994:17(2)152-154.

278. Hsueh, W.A. and Law, R.E. (1998) Cardiovascular risk continuum: implications of insulin resistance and diabetes. Am. J. Med. 105, 4S–14S.

279. Saad, M.F., Knowler, W.C., Pettitt, D.J., et al. (1991) A two-step model for development of non–insulin-dependent diabetes. Am. J. Med. 90, 229–235.

280. Legro, R.S. (2003) Polycystic ovary syndrome and cardiovascular disease: a premature association? Endocr. Rev. 24, 302-312.

281. Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., et al. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28, 412–419.

282. Arslanian, S.A., Lewy, V., Danadian, K. et al. (2002) Metformin therapy in obese adolescents with polycystic ovary syndrome and impaired glucose tolerance: amelioration of exaggerated adrenal response to adrenocorticotropin with reduction of insulinemia/insulin resistance. J. Clin. Endocrinol. Metab. 35, 1555–1559.

283. Dahlgren, E. and Janson, P.O. (1994) Polycystic ovary syndrome—long-term metabolic consequences. Int. J. Gynaecol. Obstet. 44, 3–8.

284. Cibula, D., Cifkova, R., Fanta, M., et al. (2000) Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus, arterial hypertension and coronary artery disease in perimenopausal women with a history of the polycystic ovary syndrome. Hum. Reprod. 15, 785–789.

285. Kelly, C.C., Lyall, H., Petrie, J.R., et al. (2001) Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 2453–2455.

286. Atiomo, W.U., Bates, S.A., Condon, J.E., et al. (1998) The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril. 69, 236–241.

287. Loverro, G., Lorusso, F., Mei, L., et al. (2002) Plasma homocysteine levels are increased in polycystic ovary syndrome. Gynecol. Obstet. Invest. 53, 157–162

288. Sampson, M., Kong, C., Patel, A., et al. (1996) Ambulatory blood pressure profiles and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) activity in lean women with and without the polycystic ovary syndrome. Clin. Endocrinol. (Oxf) 45, 623–629.

289. Diamanti-Kandarakis, E., Spina, G., Kouli, C., et al. (2001) Increased endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 4666–4673.

290. Conway, G.S., Agrawal, R., Betteridge, D.J., et al. (1992) Risk factors for coronary artery disease in lean and obese women with the polycystic ovary syndrome. Clin. Endocrinol. (Oxf) 37, 119–125.

291. Wild, R.A., Alaupovic, P., Parker, I.J. (1992) Lipid and apolipoprotein abnormalities in hirsute women. The association with insulin resistance. Am. J. Obstet. Gynecol. 166, 1191–1196.

292. Robinson, S, Henderson, A.D., Gelding, S.V., et al. (1996) Dyslipidaemia is associated with insulin resistance in women with polycystic ovaries. Clin. Endocrinol. (Oxf) 44, 277–284.

293. Pirwany, I.R., Fleming, R., Greer, I.A., et al. (2001) Lipids and lipoprotein subfractions in women with PCOS: relationship to metabolic and endocrine parameters. Clin. Endocrinol. (Oxf) 54, 447–453.

294. Harborne, I., Fleming, R., Norman, J., et al. (2003) Descriptive review of the evidence for the use of metformin in polycystic ovary syndrome. Lancet 31, 1894-1901.

295. Goodarzi, M. and Korenman, S. (2003) The importance of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril. 80, 255-258.

296. Dunaif, A. (1997) Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. Endocr. Rev. 18, 774–800.

297. Bruning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., et al. (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science 289, 2122–2125

298. Urbanek, M., Legro, R.S., Driscol, DA., et al. (1999)Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 8573–8578.

299. Legro, R.S., Bentley-Lewis, R., Driscoll, D., et al. (2002) Insulin resistance in the sisters of women with polycystic ovary syndrome: association with hyperandrogenemia rather than menstrual irregularity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 87, 2128–2133.

300. Moghetti, P., Castello, R., Negri, C., et al. (1996) Insulin infusion amplifies 17α-hydroxycorticosteroid intermediates response to adrenocorticotropin in hyperandrogenic women: aarent relative impairment of 17,20-lyase activity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 81, 881–886.

301. Dumesic, D.A., Abbott, D,H., Eisner, J.R., et al. (1997) Prenatal exposure of female rhesus monkeys to testosterone propionate increases serum luteinizing hormone levels in adulthood. Fertil. Steril. 67, 155–163.

302. Joshi, R. and Dunaif, A. (1995) Ovarian disorders of pregnancy. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 24, 153–169.

303. Barbieri, R.L., Saltzman, D.H., Torday, J.S., et al. (1986) Elevated concentrations of the beta-subunit of human chorionic gonadotropin and testosterone in the amniotic fluid of gestations of diabetic mothers. Am. J. Obstet. Gynecol. 154, 1039–1043.

304. Reusch, J.E. (2002) Current concepts in insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome. Am. J. Cardiol. 90, 19G–26G.

305. Sam, S. and Dunaif, A. (2003) Polycystic ovary syndrome: syndrome XX? Trends Endocrinol. Metab.14, 365-370

306. R. Azziz, E. L. Bradley Jr., H. D. Potter, and L. R. Boots,

"Adrenal androgen excess in women: lack of a role for 17- hydroxylase and 17,20-lyase dysregulation," Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 80, no. 2, pp. 400–405, 1995.

307. Dohlman HG, Caron MG, Lefkowitz RJ. A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. Biochemistry. 1987 May 19;26(10):2657-64.

308. Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, De Gouyon B, Julier C, Takahasi S, et al. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. Nature. 1991 Oct 10;353(6344):521-9.

309. Langer SZ. Presynaptic regulation of catecholamine release. Biochem Pharmacol. 1974 Jul 1;23(13):1793-800.

310. Rang, H. P. (2003). Pharmacology. Edinburgh: Churchill Livingstone. ISBN 0-443-07145-4. Page 163.

311. Starke K. Presynaptic alpha-autoreceptors. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1987;107:73-146.

312. Ruffolo RR Jr, Nichols AJ, Stadel JM, Hieble JP. Structure and function of alpha-adrenoceptors. Pharmacol Rev. 1991 Dec;43(4):475-505.

313. Bylund DB, Blaxall HS, Iversen LJ, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lomasney JW. Pharmacological characteristics of alpha 2-adrenergic receptors: comparison of pharmacologically defined subtypes with

subtypes identified by molecular cloning. Mol Pharmacol. 1992 Jul;42(1):1-5.

314. Regan JW, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. Cloning and expression of a human kidney cDNA for an alpha 2-adrenergic receptor subtype. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Sep;85(17):6301-5.

315. Ferrannini E (1988) The theoretical basis of indirect calorimetry: a review. Metabolism 37:287-301

316. Ravussin E, Lillioja S, Knowler WC, Christin L, Freymond D, Abbott WG, Boyce V, Howard BV, Bogardus C (1988) Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain. N Engl J Med. 318:467-472

317. Heinonen P, Koulu M, Pesonen U, Karvonen MK, Rissanen A, Laakso M, Valve R, Uusitupa M, Scheinin M (1999) Identification of a three-amino acid deletion in the alpha2B-adrenergic receptor that is associated with reduced basal metabolic rate in obese subjects. J Clin Endocrinol Metab. 84:2429-2433

318. Sykiotis GP, Polyzogopoulou E, Georgopoulos NA, Trakada G, Spyropoulos K, Kalfarentzos F, Papavassiliou AG, Vagenakis AG and Flordellis C (2003) The α2B adrenergic receptor deletion/insertion polymorphism in morbid obesity. Clin Auton Res 13(3):203-207

319. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR (1997) Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR

gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. Biochem Biophys Res Commun 241, 270–274

320. Kanai F, Ito K, Todaka M, Hayashi H, Kamohara S, Ishii K, Okada T, Hazeki O, Ui M, Ebina Y.(1993) Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI-3 kinase. Biochem Biophys Res Commun 195,762- 768.

321. Heinonen P, Koulu M, Pesonen U, Karvonen MK, Rissanen A, Laakso M, Valve R, Uusitupa M, Scheinin M (1999) Identification of a three-amino acid deletion in the alpha2B-adrenergic receptor that is associated with reduced basal metabolic rate in obese subjects. J Clin Endocrinol Metab. 84:2429-2433

322. Sykiotis GP, Polyzogopoulou E, Georgopoulos NA, Trakada G, Spyropoulos K, Kalfarentzos F, Papavassiliou AG, Vagenakis AG and Flordellis C (2003) The α_{2B} adrenergic receptor deletion/insertion polymorphism in morbid obesity. Clin Auton Res 13(3):203-207

323. Alevizaki M, Thalassinou L, Grigorakis SI, Philippou G, Lili K, Souvatzoglou A, Anastasiou E (2000) Study of the Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor in Greek women with gestational diabetes. Diabetes Care 23:1079-1083

324. Baldwin CT, Schwartz F, Baima J, Burzstyn M, DeStefano AL, Gavras I, Handy DE, Joost O, Martel T, Manolis A, Nicolaou M, Bresnanan M, Farrer L, Gavras H (1999) Identification of a polymorphic glutamic acid stretch in the alpha2B-adrenergic receptor and lack of

linkage with essential hypertension. Am J Hypertens.12(9 Pt 1) : 853-857

325. Buettner R, Schaffler A, Arndt H, Rogler G, Nusser J, Zietz B, Enger I, Hugl S, Cuk A, Scholmerich J, Palitzsch KD (1998) The Trp64Arg polymorphism of the beta 3-adrenergic receptor gene is not associated with obesity or type 2 diabetes mellitus in a large population-based Caucasian cohort. J Clin Endocrinol Metab. 83:2892-2897

326. Diamanti-Kantarakis E, Piperi C. Genetics of polycystic ovary syndrome: searching the way out of the labyrinth. Hum Reprod Update 2005; 11(6):631-643.

327. Qin K, Ehrmann DA, Cox N, Refetoff S, Rosenfield RL Identification of a functional polymorphism of the human type 5 17β-hydroxysteroid dehydrogenase gene associated with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(1):270-278.

328. Goodarzi MO,.Jones MR, Antoine HJ, Pall M, Chen YI, Azziz R Non-replication of the type 5 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase gene association with polycystic ovary syndrome J Clin Endocrin Metab. 2008; 93(1):300-303.

329. Petry CJ, Ong KK, Wingate DL, Zegher F,Ibanez L, Dunger DB Lack of association between common polymorphisms in the 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type V gene (HSD17B5) and precocious pubarche. J Ster Biochem & Mol Biol 2007; 105:176-180.

330. Zawadski JK, Dunaif A 1992 Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR,

Haseltine FP,Merriam GR, eds. Polycystic ovary syndrome. Boston: Blackwell Scientific Publications; 377–384

331. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Reviesed 2003 consensus on the diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome, Fertil Steril 2004; 81(1):19-25.

332. Azziz R. Controversy in clinical endocrinology. Diagnosis of polycystic ovarian syndrome: The Rotterdam criteria are premature. J Clin Endocrin Metab. 2006; 91(3):781-785.

333. Welt CK, Gudmundsson JA, Arason G, Adams J, Palsdottir H, Gudlaugsdottir G, Ingadottir G and Crowley WF Characterizing different subsets of polycystic ovary syndrome as defined by the Rotterdam criteria: The impact of weight on phenotype and metabolic features. J Clin Endocrin Metab. 2006; 91:4842-4848.

334. Cardon LR and Palmer LJ Population stratification and spurious allelic association. Lancet 2003; 361:598-604.

335. Freeman ML, Reich D, Penney KL, MacDonald GJ, Mignault AA, Patterson N, Gabriel SB, Topol EJ, Smoller JW, Pato CN, Pato MT, Petryshen TL,Kolonel LN, Lander ES, Sklar P, Henderson B, Hirschhorn JN, Altshuler D Assesing the impact of population stratification on genetic association studies. 2004; Nat Genet 36(4):388-393.

336. Keita S, Kittles RA, Royal CD, Bonney GE, Fuurbert-Harris P, Dunston GM, Rotimi CN Conceptualizing human variation. Nat Genet Supplem 2004; 36(11):517-520.

337. Azziz R., Carmina E., Dewailly D., Diamanti-Kandarakis E., Escobar-Morreale H.F., Futterweit W., et al. POSITION STATEMENT: Criteria for Defining Polycystic Ovary Syndrome as a Predominantly Hyperandrogenic Syndrome: An Androgen Excess Society Guideline. J Clin Endocrinol Metab 91(11):4237–4245

338. Diamanti-Kantarakis E., Bartzis MI, Bergiele AT, Tsianateli TC, Kouli CR Microsatellite polymorphism (tttta)n at -528 base pairs of gene CYP11α influences hyperandrogenemia in patients with polycystic ovarian syndrome. Fertil Steril 2000; 73:735-741.

339. Ehrmann DA, Barnes BB, Rosenfield RL Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. Endocr Rev 1995;16(3):322-353.

340. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE (2007) Polycystic ovary syndrome. Lancet 370, 685-97

341. Mierhaeghe A, Amouyel P (2004) Impact of genetic variation of PPARγ in humans Molecular Genetics Matabolism 83, 93-102.

342. Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, Azziz R, Ehrmann DA, Norman RJ, Strauss JF, Spielman RS and Dunaif A (1999) Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: Strongest evidence for linkage is with follistatin Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96,. 8573–8578

343. Hara M, Alcoser SY, Qaadir A, Beiswenger KK, Cox NJ, Ehrmann DA (2002) Insulin resistance is attenuated in women with polycystic ovary syndrome with the Pro(12)Ala polymorphism in the PPARgamma gene. J Clin Endocrinol Metab 87,772-775.

344. Ehrmann DA, Tang X, Yoshiuchi I, Cox NJ, Bell GI (2002) Relationship of Insulin Receptor Substrate-1 and -2 Genotypes to Phenotypic Features of Polycystic Ovary Syndrome J Clin Endocrinol Metab 87, 4297–4300

345. El Mkadem SA, Lautier C, Macari F, Molinari N, Lefebvre P, Renard E J, Gris JC, Cros G, Daures JP, Bringer J et al (2001) Role of Allelic Variants Gly972Arg of IRS-1 and Gly1057Asp of IRS-2 in Moderate-to-Severe Insulin Resistance of Women With Polycystic Ovary Syndrome DIABETES, 50

346. Sir-Petermann T, Angel B, Maliqueo M, Santos JL, Riesco MV, Toloza H, Pe´rez-Bravo F. (2004) Insulin Secretion in Women Who Have PolycysticOvary Syndrome and Carry the Gly972Arg Variant of Insulin Receptor Substrate-1 in Response to a High-Glycemic or Low-Glycemic Carbohydrate Load Nutrition 20, 905-910.

347. Villuendas G, Botella-Carretero JI, Roldán B, Sancho J, Escobar-MorrealeHF, San Millán JS (2005) Polymorphisms in the insulin receptor substrate-1 (IRS-1)gene and the insulin receptor substrate-2 (IRS-2) gene influence glucose homeostasis and body mass index in women with polycystic ovary syndrome and non-hyperandrogenic controls Human Reproduction 20, 3184–3191

348. Hahn SA, Fingerhut A, Khomtsiv U, Khomtsiv L, Tan S, Quadbeck B, Herrmann BL, Knebel B, Muller-Wieland D, Mann K et al (2005) The peroxisome proliferator-activated receptor gamma Pro12Ala polymorphism is associated with lower hirsutism score and

increased insulin sensitivity in women with polysystic ovary syndrome Clinical Endocrinology 62, 573-579

349. Orio F, Palomba S, Cascella T, Di Biase S, Labella D, Russo T, Savastano S, Zullo F, Colo A, Vettor R et al (2004) Lack of association between peroxisome proliferaror-activated receptor –γ gene Pro12Ala polymorphism and adiponectin levels in the polycystic ovary syndrome J Clin Endocrinol Metab 89, 5110-5115

350. Korhonen S, Heinonen S, Hiltunen M, Helisalmi S, Hippelainen M, Koivunen R, Tapanainen JS, Laakso M (2003) Polymorphism in the peroxisome proliferator –activated receptor-γ gene in women with polycystic ovary syndrome Human reproduction 18, 540-543.

351. Hahn SA, Fingerhut A, Khomtsiv U, Khomtsiv L, Tan S, Quadbeck B, Herrmann BL, Knebel B, Muller-Wieland D, Mann K et al (2005) The peroxisome proliferator-activated receptor gamma Pro12Ala polymorphism is associated with lower hirsutism score and increased insulin sensitivity in women with polysystic ovary syndrome Clinical Endocrinology 62, 573-579

352. Tok EC, Aktas A, Ertunc D, Erdal EM, Dilek S (2005) Evaluation of glucose metabolism and reproductive hormones in polycystic ovary syndrome on the basis of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-γ2 Pro12Ala genotype Human Reproduction 20, 1590-1595

353. Yilmaz M, Ali Ergun M, Karakoc A, Yurtcu E, Cakir N, Arslan M (2006) Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-γ gene in women with polycystic ovary syndrome Gynecological Endrocrinology 22, 336-342.

354. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. (1998) A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity, Nat. Genet 20, 284–287.

355. Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D, Dariush E, Cheskin LJ, Andres R, Roth J, Shuldiner AR (1998) Association of the Pro12Ala Variant in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- 2 Gene With Obesity in Two Caucasian Populations Diabetes 47, 1806-1808

356. Valve R, Sivenius K, Miettinen R, Pihlajamäki J, Rissanen A, Deeb SS, Auwerx J, Uusitura M, Laakso M (1999). Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women. J Clin Endocrinol Metab 84, 3708-3712.

357. Stumvoll M, Wahl HG, Loblein K, Becker R, Machicao F, Jacob S, Haring H (2001) Pro12Ala Polymorphism in the Peroxisome Proliferator–Activated Receptor-g2 Gene Is Associated With Increased Antilipolytic Insulin Sensitivity Diabetes 50, 876-881

358. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Liñan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. (1997) Peroxisome proliferator- activated receptor gene expression in human tissues: effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. J Clin Invest 99, 2416 –2422.

359. Georgopoulos NA, Saltamavros AD, Vervita V, Karkoulias K, Adonakis G, Decavalas G, Kourounis G, Markou KB, Kyriazopoulou V. Basal metabolic rate is decreased in women with polycystic ovary syndrome and biochemical hyperandrogenemia and is associated with insulin resistance. Fertil Steril. 2008 Aug 2. [Epub ahead of print]

360. Ehrmann DA, Tang X, Yoshiuchi I, Cox NJ, Bell GI (2002) Relationship of Insulin Receptor Substrate-1 and -2 Genotypes to Phenotypic Features of Polycystic Ovary Syndrome J Clin Endocrinol Metab 87, 4297–4300

361. El Mkadem SA, Lautier C, Macari F, Molinari N, Lefebvre P, Renard E J, Gris JC, Cros G, Daures JP, Bringer J et al (2001) Role of Allelic Variants Gly972Arg of IRS-1 and Gly1057Asp of IRS-2 in Moderate-to-Severe Insulin Resistance of Women With Polycystic Ovary Syndrome DIABETES, 50

362. Sir-Petermann T, Angel B, Maliqueo M, Santos JL, Riesco MV, Toloza H, Pe´rez-Bravo F. (2004) Insulin Secretion in Women Who Have PolycysticOvary Syndrome and Carry the Gly972Arg Variant of Insulin Receptor Substrate-1 in Response to a High-Glycemic or Low-Glycemic Carbohydrate Load *Nutrition* 20, 905-910.

363. Dilek S,Ertnuc D,Toc EC, Erdal EM, Aktas A (2005) Association of Gly972Arg variant of insulin receptor substrate-1 with metabolic features in women with polycystic ovary syndrome Fertil Steril 84, 407-412.

364. Villuendas G, Botella-Carretero JI, Roldán B, Sancho J, Escobar-MorrealeHF, San Millán JS (2005) Polymorphisms in the

insulin receptor substrate-1 (IRS-1)gene and the insulin receptor substrate-2 (IRS-2) gene influence glucose homeostasis and body mass index in women with polycystic ovary syndrome and non-hyperandrogenic controls Human Reproduction 20, 3184–3191.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Clin Auton Res (2007) 17:112–114
DOI 10.1007/s10286-007-0403-6

RESEARCH LETTER

$\alpha_{2\beta}$ adrenoreceptor 301–303 deletion polymorphism in polycystic ovary syndrome

Alexandros D. Saltamavros
George Adonakis
Sosanna Kritikou
Vasiliki Koika
Kleanthis Koufogiannis
Kostas Spyropoulos
George Kourounis
Christodoulos Flordellis
Venetsana Kyriazopoulou
Neoklis A. Georgopoulos

Received: 1 June 2006
Accepted: 5 February 2007
Published online: 16 March 2007

A.D. Saltamavros · G. Adonakis
V. Koika · K. Koufogiannis
G. Kourounis · N.A. Georgopoulos (✉)
Dept. of Obstetrics and Gynecology
Division of Reproductive Endocrinology
University of Patras Medical School
University Hospital
26500 Patras, Greece
E-Mail: neoklisg@hol.gr

A.D. Saltamavros · V. Kyriazopoulou
Dept. of Internal Medicine
Division of Endocrinology
University of Patras Medical School
University Hospital
Patras, Greece

S. Kritikou · C. Flordellis
Dept. of Pharmacology
University of Patras Medical School
Patras, Greece

K. Spyropoulos
Dept. of Internal Medicine
Division of Pulmonology
University of Patras Medical School
University Hospital
Patras, Greece

Abstract $\alpha_{2\beta}$ adrenoreceptor 301–303 deletion polymorphism does not influence basal metabolic rate, insulin resistance or weight gain in Greek women with polycystic ovary syndrome.

Key words polycystic ovary syndrome · body weight · obesity · insulin resistance · basal metabolism · adrenoreceptor polymorphism · autonomic nervous system

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS), the most common hormonal reproductive problem in women of childbearing age, is associated with high blood pressure, weight gain and type II diabetes [5, 8, 9, 11]. These are known risk factors in coronary heart disease [4], a disease that is hereditary. A 301–303 deletion polymorphism of the $\alpha_{2\beta}$ adrenergic receptor is associated with reduced agonist-promoted desensitization [9, 11] and has been linked to low basal metabolic rate and gain weight [3, 10]. This raises the question of whether $\alpha_{2\beta}$ adrenergic receptor polymorphism is present in PCOS.

Materials and methods

Subjects

A total of 112 Greek women with PCOS (age; mean ± SEM 24.0 ± 1.0, range 18–42 years; mean body mass index, 26.7 ± 1.6 kg/m^2) and 114 healthy women (age; mean 27.0 ± 1.0, range 21–43 years; mean body mass index 19.1 ± 1.0 kg/m^2) were recruited.

The diagnosis of PCOS was based on the revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome [1, 7]. All controls were regularly menstruating.

Methods

A standard Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) with 100 g glucose was carried out and insulin resistance was assessed by determining the fasting insulin levels, the fasting glucose/insulin ratio, the

CAR 403

HOMA and QUICKI indexes as well as the AUC for the OGTT derived glucose values. Body composition was determined by bioelectrical impedance. BMR was measured by indirect calorimetry as previously described [2] and expressed as kilocalories per day. Each subject's BMR was adjusted for fat-free mass, fat mass, sex and age using the equation: adjusted BMR = (group mean BMR) + (measured BMR − predicted BMR) [6]. For each subject, the predicted BMR was obtained by substituting the individual lean body mass, fat mass, sex and age in the linear regression equation generated by the data of all patients.

Genotyping

Genomic DNA was extracted by a commercial kit (Nucleospin Blood QuickPure, Macherey-Nagel, Düren, Germany). A fragment of the $\alpha_{2\beta}$ adrenoceptor gene encompassing the polymorphic glutamate repeat was amplified by the polymerase chain reaction (PCR), as previously described [3]. Oligonucleotide primers were synthesized by MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany.

Association analyses

The genotype frequency distributions were tested for Hardy–Weinberg equilibrium and compared by χ^2 tests. The adjusted BMR was compared between genotype groups by one-way ANOVA. The main effects of genotype on BMI, and insulin resistance were evaluated by multivariate analysis of variance (MANOVA). All statistical procedures were performed using SPSS 11.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). All data are expressed as mean ± SEM unless otherwise stated.

Results

The α_{2B} genotype frequencies in the control group were 73 (64.00%) Glu^{12}/Glu^{12}, 36 (31.60 %) Glu^{12}/Glu^{9} $\kappa\alpha\imath$ 5 (4.40%) Glu^{9}/Glu^{9} and in women with PCOS 68 (60.70%) Glu^{12}/Glu^{12}, 41 (36.60%) Glu^{12}/Glu^{9} $\kappa\alpha\imath$ 3 (2.70%) Glu^{9}/Glu^{9}. There were no statistically significant differences between patients and controls. Allelic frequency was 182 (79.80%) for the Glu^{12} and 46 (20.20%) for the Glu^{9} in the control group and 177 (79.00%) for the Glu^{12} and 47 (21.00%) for the Glu^{9} in the women with PCOS.

The adjusted BMR of 73 patients (48 Glu^{12}/Glu^{12} and 25 Glu^{12}/Glu^{9}) was compared for the α_{2B} adrenoreceptor genotypes.

The adjusted BMR was 1347.80 ± 100.40 (n = 48) Cal/day for Glu^{12}/Glu^{12} homozygotes, 1408.20 ± 130.30 Cal/day for heterozygotes (n = 25), and 1856.29 ± 973.26 (n = 2) Cal/day for Glu^{9}/Glu^{9} subjects. Thus, the mean adjusted BMR of Glu^{12}/Glu^{9} heterozygotes was 60.40 Cal/day higher than that of Glu^{12}/Glu^{12} homozygotes. Despite this trend, the differences in BMR were not statistically significant (p = 0.72) (Table 1).

MANOVA showed that the $\alpha_{2\beta}$ adrenoceptor polymorphism was not associated with the patients' BMI and insulin resistance (Table 1).

Discussion

This study showed that genotype distribution and the frequency of the $\alpha_{2\beta}$ adrenergic receptor alleles was not different in Greek women with PCOS and controls.

Genotyping of Greek women for the α_{2B} 301–303 deletion polymorphism showed that the majority of subjects were homozygous for the long receptor allele, while in the Finnish population most subjects are heterozygous [3]. In our cohort, the α_{2B} polymorphic variant was uncommon, with a Glu^{9} allelic frequency of 20.20%, compared to 45% in obese Finns. Moreover, genotype distribution and allelic frequencies did not differ between PCOS women and controls. This implies that the α_{2B} polymorphism has little impact on obesity, at least in this population of Greek women with PCOS. This view is compatible with a previous study that showed no association between the $\alpha_{2\beta}$ adrenoreceptor gene polymorphism and morbid obesity in the Greek population [10]. These studies suggest that the $\alpha_{2\beta}$ adrenoreceptor gene polymor-

Table 1 Physical and biochemical characteristics of the PCOS women according to the genotype of the $\alpha_{2\beta}$ adrenergic receptor gene polymorphism

Characteristic	Genotype			p value (by ANOVA)
	Total (n = 109)	Glu^{12}/Glu^{12} (n = 68)	Glu^{12}/Glu^{9} (n = 41)	
Age (years)	23.98 ± 5 (n = 93)	23.62 ± 0.5 (n = 61)	24.91 ± 1.2 (n = 32)	0.25
Weight (kg)	70.9 ± 17.4 (n = 92)	70.65 ± 2.18 (n = 61)	72.43 ± 3.28 (n = 31)	0.65
Height (cm)	164 ± 1.4 (n = 78)	163 ± 0.8 (n = 51)	165 ± 1 (n = 27)	0.17
BMI (kg/m^2)	26.7 ± 1.60 (n = 74)	26.64 ± 0.92 (n = 48)	27.27 ± 1.34 (n = 26)	0.7
Adjusted BMR (Cal/day)	1381.5 ± 167.9 (n = 73)	1347.8 ± 100.4 (n = 48)	1408.2 ± 130.3 (n = 25)	0.72
Fasting glucose (mg/dL)	82.13 ± 2.6 (n = 86)	81.29 ± 1.2 (n = 58)	83.82 ± 2.9 (n = 28)	0.34
Fasting insulin (μU/ml)	11.64 ± 1.8 (n = 84)	11.87 ± 1.0 (n = 57)	11.60 ± 1.5 (n = 27)	0.88
HOMA	70.43 ± 16.27 (n = 84)	67.56 ± 7.83 (n = 57)	75.31 ± 16.96 (n = 27)	0.63
QUICKI	0.350 ± 0.01 (n = 84)	0.349 ± 0.005 (n = 57)	0.352 ± 0.009 (n = 27)	0.78
AUC	13562 ± 757 (n = 84)	13177 ± 412 (n = 57)	14455 ± 673 (n = 27)	0.1
Glucose/insulin ratio	10.54 ± 2.00 (n = 84)	10.21 ± 1.00 (n = 57)	10.96 ± 2.01 (n = 27)	0.71

Data are presented as mean ± SE of the mean

phism is not associated with an increased incidence of mild or morbid obesity.

To our knowledge, this is the first study of α_{2B} adrenoreceptor 301–303 deletion polymorphism in relation to PCOS, which also took into account BMR and insulin resistance. There was no significant correlation between the $\alpha_{2\beta}$ polymorphism, BMR and insulin resistance.

The genetic determinants of BMR, insulin resistance and PCOS are largely unknown. It is possible that the α_{2B} polymorphism may have a role in the pathogenesis of the metabolic syndrome, but due to the complexity of PCOS the correlation of the polymorphism to the specific parameters of this study may be too small to be detected. The relatively small number of patients and the rarity of the Glu^9/Glu^9 genotype, imply the need for additional studies with larger cohorts in order to establish a definite conclusion.

This small study showed that the $\alpha_{2\beta}$ adrenoreceptor gene polymorphism does not determine basal metabolic rate, weight gain or insulin resistance in Greek women with PCOS. The role of 301–303 deletion polymorphism in PCOS, if any, remains unclear.

References

1. Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR (1992) Current issues in endocrinology and metabolism: polycystic ovary syndrome. Blackwell, Boston, pp 377–384
2. Ferrannini E (1988) The theoretical basis of indirect calorimetry: a review. Metabolism 37:287–301
3. Heinonen P, Koulu M, Pesonen U, Karvonen MK, Rissanen A, Laakso M, Valve R, Uusitupa M, Scheinin M (1999) Identification of a three-amino acid deletion in the alpha2B-adrenergic receptor that is associated with reduced basal metabolic rate in obese subjects. J Clin Endocrinol Metab 84:2429–2433
4. Lakhani K, Prelevic GM, Seifalian AM, Atiomo WU, Hardiman P (2004) Polycystic ovary syndrome, diabetes and cardiovascular disease: risks and risk factors. J Obstet Gynaecol 24(6):613–621, Review
5. Muszkat M, Kurnik D, Solus J, Sofowora GG, Xie HG, Jiang L, McMunn C, Ihrie P, Harris JR, Dawson EP, Williams SM, Wood AJ, Stein CM (2005) Variation in the alpha2B-adrenergic receptor gene (ADRA2B) and its relationship to vascular response in vivo. Pharmacogenet Genomics 15(6):407–414
6. Ravussin E, Lillioja S, Knowler WC, Christin L, Freymond D, Abbott WG, Boyce V, Howard BV, Bogardus C (1988) Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain. N Engl J Med 318:467–472
7. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group (2004) Rotterdam 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 81(1):19–25
8. Schroder AK, Tauchert S, Ortmann O, Diedrich K, Weiss JM (2004) Insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome. Ann Med 36(6):426–439, Review
9. Small Kersten M, Brown Kari M, Forbes Susan L, Liggett Stephen B (2001) Polymorphic deletion of three intracellular acidic residues of the *A*2B-adrenergic receptor decreases g protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization. J Biol Chem 276(7):4917–4922
10. Sykiotis GP, Polyzogopoulou E, Georgopoulos NA, Trakada G, Spyropoulos K, Kalfarentzos F, Papavassiliou AG, Vagenakis AG, Flordellis C (2003) The α2B adrenergic receptor deletion/insertion polymorphism in morbid obesity. Clin Auton Res 13(3):203–207
11. Talke P, Stapefeldt C, Lobo E, Brown R, Scheinin M, Snapir A (2005) Alpa-2B adrenoreceptor polymorphism and peripheral vasoconstriction. Pharmacogenet Genomics 15(5):357–363

Basal metabolic rate is decreased in women with polycystic ovary syndrome and biochemical hyperandrogenemia and is associated with insulin resistance

Neoklis A. Georgopoulos, M.D.,[a,b] *Alexandros D. Saltamavros, M.D.,*[a,b] *Vasiliki Vervita, M.D.,*[a,b] *Kyriakos Karkoulias, M.D.,*[c] *George Adonakis, M. D.,*[a,b] *George Decavalas, M.D.,*[b] *George Kourounis, M.D.,*[b] *Kostas B. Markou, M.D.,*[d] *and Venetsana Kyriazopoulou, M.D.*[d]

[a] Division of Reproductive Endocrinology, [b] Department of Obstetrics and Gynecology, Divisions of [c]Pulmonology and [d] Endocrinology, Department of Internal Medicine, University of Patras Medical School, Patras, Greece

Objective: To evaluate basal metabolic rate (BMR) in women with PCOS and to determine its association with insulin resistance (IR).
Design: Prospective assessment of BMR in women with PCOS.
Setting: Outpatient clinic of the Division of Reproductive Endocrinology.
Patient(s): The study included 91 Greek women with PCOS and biochemical hyperandrogenemia, with mean age 24.03 ± 0.55 years and mean body mass index (BMI) 26.67 ± 0.69 kg/m^2, and 48 matched regularly menstruating women, with mean age 26.33 ± 0.93 years and mean BMI 23.35 ± 0.85 kg/m^2, as control subjects.
Intervention(s): Assessment of BMR by indirect calorimetry, IR by HOMA and QUICKI indices, fasting insulin, and fasting glucose/insulin ratio.
Main Outcome Measure(s): Reduced BMR in PCOS with or without IR.
Result(s): Adjusted BMR was 1,868 ± 41 kcal/day in the control group, 1,445.57 ± 76 in all PCOS women, 1,590 ± 130 in PCOS women without IR and 1,116 ± 106 in PCOS women with IR. Adjusted BMR showed a statistically significant difference between women with PCOS and control subjects, with lowest values in the group of PCOS women with IR, even after adjusting all groups for age and BMI.
Conclusion(s): Women with PCOS, particularly those with IR, present a significantly decreased BMR. (Fertil Steril® 2008;■:■–■. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: PCOS, insulin resistance, basal metabolic rate, BMR

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the leading cause of anovulatory infertility in women (1). It is characterized by hirsutism, anovulation, and hyperandrogenemia and is highly associated with obesity and insulin resistance (IR) (2). Insulin resistance plays a significant role as both a cause and as a result of the syndrome (3); altering lifestyle or pharmacologic intervention has been shown to improve hyperandrogenism and infertility and reduce cardiovascular risk (4). A reduction of insulin sensitivity has been shown in lean PCOS patients compared with lean control subjects (5). Insulin, androgens, and body mass index (BMI) are in correlation in women both with and without PCOS (3). Phenotypic expression varies from hyperinsulinemic and nonhyperandrogenic obesity to nonhyperinsulinemic obese PCOS. Women with PCOS have a 35%–40% decrease in insulin sensitivity, similar to that seen in type 2 diabetes mellitus (6). Approximately, 50%–70% of obese women present various degrees of IR (7). Insulin resistance affects over 25% of the general population and depends upon the degree of obesity (7).

Basic metabolic rate (BMR) is the energy expenditure of a healthy subject at rest and at least 12 h after eating in a thermally neutral environment. It represents 50%–70% of total daily energy expenditure (8) Basic metabolic rate is associated with lean body mass, gender, age, and climate.

Many studies have been conducted on BMR in obesity, presuming that low energy expenditure could play a role in the energy imbalance that characterizes obesity. The reported values of BMR in obesity, when expressed in relationship to lean body mass or to the body surface area, are usually within normal range (9, 10). In other studies, BMR has been associated with obesity (11), but BMR appears to be linked to morbid rather than to moderate obesity (12). A low BMR is considered to be a factor predisposing to obesity, as was shown in a Finnish study (13), and PCOS is characterized by an increased BMI, although not all PCOS women are obese.

Low BMR might be a predisposing factor for obesity and increased IR in women with PCOS. Therefore, the aim of

Received February 2, 2008; revised April 25, 2008; accepted April 28, 2008.
N.G. has nothing to disclose. A.S. has nothing to disclose. V.V. has nothing to disclose. K.K. has nothing to disclose. G.A. has nothing to disclose. G.D. has nothing to disclose. G.K. has nothing to disclose. K.M. has nothing to disclose. V.K. has nothing to disclose.
Reprint requests: Neoklis A. Georgopoulos, Division of Reproductive Endocrinology, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Patras Medical School, University Hospital, 26500 Patras, Greece (FAX: +302610993982; E-mail: neoklisg@hol.gr).

Copyright ©2008 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

the present study was to evaluate BMR in women with PCOS and biochemical hyperandrogenemia and to determine its association with IR.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

The study included 91 Greek women with PCOS, with a mean age of 24.03 ± 0.55 years and a mean BMI of 26.67 ± 0.69 kg/m^2, and 48 age- and BMI-matched regularly menstruating women, with a mean age of 26.33 ± 0.93 years and a mean BMI 23.35 ± 0.85 kg/m^2, as control subjects. Institutional Review Board approval was obtained by the University Hospital Ethical Committee.

The diagnosis of PCOS was based on the presence of biochemical hyperandrogenism and chronic anovulation (14) and polycystic ovarian morphology on ultrasound (14), thus meeting the criteria of the experts meeting in Rotterdam in 2003, sponsored by the European Society of Human Reproduction and Embryology and the American Society for Reproductive Medicine (14). Biochemical hyperandrogenism was defined as an increased serum T and/or an increased free androgen index (FAI). We considered a woman to have hyperandrogenemia when she had serum T levels and/or serum FAI higher than 2 standard deviations above the mean levels of a normal control population.

Exclusion criteria were congenital adrenal hyperplasia, androgen-secreting tumors, and Cushing syndrome. All subjects had normal thyroid, kidney, and liver function, and none had excessive alcohol intake (<28 g/day). None were taking drugs known to affect BMR, blood pressure, or glucose metabolism. All physical and biochemical data were obtained in the morning after a 12-h fast using standardized methods. Physical measurements included weight, height, fat-free mass, fat mass, systolic and diastolic blood pressure, and resting heart rate.

Biochemical parameters included serum T, free T, androstenedione, total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, and glucose levels.

A standard oral glucose tolerance test (OGTT) with 75 g glucose was carried out. Insulin resistance was assessed by determining fasting insulin levels, fasting glucose levels, the fasting glucose/insulin ratio, the homeostasis model assessment (HOMA), the quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI), and the area under the curve (AUC) for the OGTT-derived insulin and glucose values.

METHODS

Body composition was determined by bioelectric impedance (BC-418 Body Composition Analyzer; Tanita, Middlesex, U.K.). The BMR was measured by indirect calorimetry (Pulmolab EX505; Morgan Medical, Kent, U.K.) as previously described by Ferrannini (15) and expressed as kcal/day. Each subject's BMR was adjusted for fat-free mass, fat mass (calculated by Hume's formula) (16), gender, and age as previously described (15), using the equation:

$$\text{adjusted BMR} = (\text{group mean BMR}) + (\text{measured BMR} - \text{predicted BMR})$$

For each subject the predicted BMR was obtained by substituting the individual lean body mass, fat mass, gender, and age in the linear regression equation generated by the data of all patients. The study complied with the principles of the Helsinki Declaration; all subjects gave their informed consent.

Insulin Resistance was assessed by HOMA and QUICKI, the fasting serum insulin, and the fasting serum glucose/insulin ratio.

Calculation of HOMA and QUICKI was made according to the following formulas:

$$\text{HOMA} = 22.5 \times 18/\text{fasting insulin} \times \text{fasting glucose}\ (17, 18)$$

$$\text{QUICKI} = 1/\log(\text{fasting insulin}) + \log(\text{fasting glucose})(18)$$

The AUC for insulin and glucose values derived from the OGTT were calculated based on Tai's mathematical model (19):

Impaired glucose tolerance (IGT) was indicated by glucose levels between 140 and 200 mg/dL 2 h after an oral 75 g glucose load (OGTT).

All assays for hormonal determinations were performed by electrochemiluminescence quantitation (Elecsys 2010; Roche Diagnostics, Laval, Quebec) with the exception of serum androstenedione and 17OH-progesterone, which were determined by radioimmunoassay using commercially available kits (B-1400; BioSource, Nivelles, Belgium). Serum lipids were determined by an automatic biochemical analyzer (Medicon, Olympus, Greece).

Ovarian morphology was assessed using a 5-MHz linear-array transvaginal transducer in days 2–4 of the menstrual cycle.

Statistics

The Pearson product-moment correlation coefficient, with two-tailed test of significance, was used to assess all studied relationships. The independent-sample t test, with two-tailed test of statistical significance, and the Levene test for equality of variances were used to assess the power of all relationships within the groups of women with PCOS with or without IR and the control group. Correlations with a critical value of $P<.05$ were considered to be significant. All statistical procedures were performed using SPSS 15.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

The general characteristics of PCOS patients are shown in Table 1.

In the control group (n = 48), the adjusted BMR was 1,841.05 ± 44 kcal/day and BMI was 23.35 ± 0.85 kg/m^2, whereas in PCOS women (n = 91) the adjusted BMR was 1,445.57 ± 76 kcal/day and BMI was 26.67 ± 0.69 kg/m^2. The adjusted BMR was significantly lower in PCOS women compared with the control group ($P<.001$).

The BMI was correlated to all parameters of IR. More specifically, it was positively correlated to fasting insulin ($P<.001$), AUC-glucose ($P<.001$) and AUC-insulin ($P<.001$); it was negatively correlated to fasting glucose/insulin ratio ($P=.004$), HOMA ($P<.001$), and QUICKI ($P<.001$). In addition, BMI presented a positive correlation with triglycerides ($P=.014$) and a negative correlation with HDL ($P<.001$). The AUC-insulin and AUC-glucose showed correlation with all indices of IR. Additionally, the AUC-glucose was correlated with LDL and cholesterol ($P<.01$), and the AUC-insulin with triglycerides ($P<.01$).

Serum T was positively correlated to fasting glucose/insulin ratio ($P<.001$), HOMA ($P<.001$), and QUICKI ($P=.007$).

Impaired glucose tolerance was noted in 7 out of 110 women with PCOS (6.36%).

Subsequently, we divided all PCOS women according to IR indices into two subgroups: those with IR (PCOS-IR; n = 25; fasting insulin >12 mU/mL, Glu/Ins <6.4, HOMA <47, QUICKI <0.333), and those without IR (PCOS-NIR;

TABLE 1

General characteristics of all of the women with PCOS (PCOS-Total), PCOS women without IR (PCOS-NIR), and PCOS women with IR (PCOS-IR) (mean ± SEM).

	PCOS-Total	PCOS-NIR	PCOS-IR	*P* value[a]
Age (yrs)	23.85 ± 0.46 n = 123	23.56 ± 0.68 n = 59	23.97 ± 1.03 n = 31	.733
BMI (kg/m^2)	26.74 ± 0.67 n = 92	24.79 ± 0.76 n = 46	30.45 ± 1.51 n = 25	.002
BMR (kcal/day)	1461.28 ± 75.72 n = 90	1553.87 ± 805.90 n = 46	1174.56 ± 454.38 n = 25	.013
Fasting insulin (μIU/mL)	11.37 ± 0.70 n = 110	6.32 ± 0.30 n = 59	20.86 ± 1.13 n = 31	<.001
Fasting glucose/insulin	10.46 ± 0.80 n = 108	14.84 ± 1.19 n = 59	4.24 ± 0.18 n = 31	<.001
HOMA	70.40 ± 6.43 n = 108	103.38 ± 9.85 n = 59	25.27 ± 1.41 n = 31	<.001
QUICKI	0.351 ± 0.00 n = 108	0.38 ± 0.00 n = 59	0.310 ± 0.00 n = 31	<.001
Cholesterol (mg/dL)	201.32 ± 4.90 n = 91	200.52 ± 7.97 n = 46	195.83 ± 7.33 n = 24	.703
Triglycerides (mg/dL)	99.37 ± 4.84 n = 90	92.49 ± 6.00 n = 45	98.42 ± 9.27 n = 24	.579
HDL (mg/dL)	57.50 ± 1.63 n = 90	60.07 ± 2.54 n = 46	55.00 ± 3.25 n = 24	.235
LDL (mg/dL)	124.81 ± 4.15 n = 89	123.93 ± 6.59 n = 45	121.22 ± 5.78 n = 24	.758
Testosterone (ng/mL)	2.46 ± 0.18 n = 115	2.66 ± 0.32 n = 59	2.11 ± 0.20 n = 30	.239
Androstenedione (ng/mL)	3.14 ± 0.13 n = 112	3.18 ± 0.17 n = 58	3.04 ± 0.26 n = 28	.639
Free androgen index	0.64 ± 0.15 n = 107	0.73 ± 0.28 n = 54	0.60 ± 0.17 n = 28	.748

Note: BMI = body mass index; BMR = basal metabolic rate; HDL = high-density lipoprotein; HOMA = homeostasis model assessment; IR = insulin resistance; LDL = low-density lipoprotein; PCOS = polycystic ovary syndrome; QUICKI = quantitative insulin sensitivity check index.

[a] *P* values refer to correlations between PCOS-NIR and PCOS-IR.

Georgopoulos. Basal Metabolic Rate in PCOS. Fertil Steril 2008.

n = 43; fasting insulin <12 mU/mL, Glu/Ins >6.4, HOMA >47, QUICKI >0.333). Twenty-three out of 91 PCOS women did not fit all the applied criteria for IR and therefore were not included in these two subgroups.

The results of these two subgroups (PCOS-IR and PCOS-NIR) concerning all parameters, including age, BMI, and adjusted BMR, are shown in Table 1. The adjusted BMR was significantly lower in both PCOS-IR and PCOS-NIR compared with the control group ($P<.001$). Furthermore, we adjusted the two subgroups (PCOS-IR and PCOS-NIR) and the control group for both age and BMI, and these results are shown in Table 2. To match all three subgroups for both age and BMI, the included patients had to be further decreased to 40 PCOS-NIR patients, 20 PCOS-IR patients, and 35 control subjects. Adjusted BMR still showed a statistically significant difference among all three age- and BMI-adjusted groups, with higher values in the control group and lowest in the PCOS-IR group ($P=.007$ between PCOS-NIR and PCOS-IR; $P<.001$ between PCOS-IR and control; $P=.048$ between PCOS-NIR and control; Table 2).

DISCUSSION

Polycystic ovary syndrome is a multifactorial syndrome characterized by hirsutism, chronic anovulation, and hyperandrogenemia and highly associated with obesity and insulin resistance (3). The selection criteria for the women with PCOS included in the present study were based on the presence of biochemical hyperandrogenism, chronic anovulation, and polycystic ovarian morphology on ultrasound. The aim for these strict selection criteria was to eliminate "gray zones" from the study group to achieve the maximum presence of the basic characteristics of the syndrome, namely the hyperandrogenism and the chronic anovulation. Accordingly, for the selection of the two subgroups of PCOS women with and without IR, we also applied strict criteria by excluding all women that only partly fulfilled the criteria of IR and by including only those PCOS women which were insulin resistant based on four different criteria for the evaluation of IR. The aim of the study was to create a clearly defined group of women with PCOS and IR. Finally, the obtained BMR of all patients included in the study was modified for fat-free body mass, percentage body fat, age, and gender, to be evaluated independently of these parameters, which are known to affect its estimation (20).

To our knowledge, BMR in women with PCOS has not been extensively studied. In a small group of PCOS patients, no differences were detected (21), although, after meal, thermogenesis in women with PCOS is diminished (22), as in women with obesity (23). The studies of BMR in obesity are contradictory. The BMR values in obesity are reported to be within normal range (9, 10) or increased (11), but BMR appears to be linked to morbid rather than to moderate obesity (12). Furthermore, although in a previous study from Finland, obesity has been reported to result from low basal metabolism (13), other studies have shown that obese individuals, compared with lean, present increased energy consumption (24).

In women with PCOS in the present study, adjusted BMR was decreased compared with control subjects, independently of obesity and IR. Adjusted BMR was significantly decreased both in women with PCOS with or without IR and particularly in women with PCOS and IR.

Chronic anovulation can partly explain the presence of decreased BMR in women with PCOS. The BMR has been reported to be decreased in athletes with menstrual disturbances and chronic anovulation (25, 26). Nevertheless, low energy consumption has been reported in menopausal women owing to their deficit in serum estrogens and P (27), whereas women with PCOS, though hyperestrogenic rather than hypoestrogenic, have constantly low serum P levels. The fact that PCOS women present a low metabolic rate could be the result of an adaptation to an environment of caloric deprivation which might begin even from the intrauterine life.

TABLE 2

Adjusted age, BMI, and BMR in PCOS women with (PCOS-IR) and without (PCOS-NIR) IR and the control group.

	PCOS-IR (n = 19) vs. PCOS-NIR (n = 43)	PCOS-IR (n = 19) vs. control (n = 23)	PCOS-NIR (n = 43) vs. control (n = 23)
Age (yrs)	23.12 ± 1.07 vs. 23.38 ± 0.67 *P*=ns	23.12 ± 1.07 vs. 25.17 ± 0.78 *P*=ns	23.38 ± 0.67 vs. 25.17 ± 0.78 *P*=ns
BMI (kg/m^2)	27.10 ± 1.38 vs. 24.54 ± 0.78 *P*=ns	27.10 ± 1.38 vs. 23.70 ± 1.02 *P*=ns	24.54 ± 0.78 vs. 23.70 ± 1.02 *P*=ns
BMR (kcal/day)	1,087 ± 106 vs. 1,562 ± 124 *P*=.012	1,087 ± 106 vs. 1,795 ± 0.820 *P*=.012	1,562 ± 124 vs. 1,795 ± 0.820 *P*=.004

Note: Correlation coefficients. Abbreviations as in Table 1.

Georgopoulos. Basal Metabolic Rate in PCOS. Fertil Steril 2008.

It is reported that girls with precocious puberty presented lower birth weights (28), while among postmenarcheal girls with a history of premature pubarche birth weights were lower in those with a functional ovarian hyperandrogenism and insulin hyperresponsiveness (28). Therefore, low basal metabolism in women with PCOS, particularly in those with IR, could be regarded to be the result of a deviation from normal, starting very early in life. This deviation might be an adaptation started during intrauterine life, in an environment of low energy input, which has led to a compensatory increase in body fat and a decrease in energy expenditure.

Women with PCOS and IR presented a significantly lower adjusted BMR compared with both women with PCOS without IR and normal women and a significantly greater BMI compared with women with PCOS without IR. It is known that obesity and IR are related to an imbalance in energy input and energy consumption. Fat tissue, not only as a deposit tissue, but also through its function as a hormone-producing tissue plays a critical role in the homeostasis of body fuels (29). Studies in the general population concerning the influence of IR on BMR results are conflicting. In obese individuals it was reported that basal energy expenditure was related neither to IR nor to dietary intake (20). In obese women with noninsulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) a negative energy consumption rate was reported (30), whereas in lean NIDDM a low thermogenesis was found (31).

In the present study, adjusted BMR was decreased in PCOS women without IR and even more decreased in PCOS women with IR. Based on the calculation of the adjusted BMR, which is corrected for body fat and body weight, obesity per se can not explain the above findings. Furthermore, women with PCOS with and without IR were matched for age and BMI with the control group of normally menstruating women. It appears, therefore, that IR constitutes an independent aggravating parameter which contributes in the greater reduction of the decreased BMR in PCOS women. The BMR remains constant throughout the day, representing 60%–70% of the total energy consumption. Therefore, based on the results of the present study, women with PCOS are consuming a decreased amount of energy and should decrease their caloric energy intake to maintain their body weight within normal limits. Increase in body weight further augments IR and menstrual disturbances, creating a vicious circle. It is well known that weight reduction is a major priority in the management of PCOS. In obese PCOS, weight reduction restores normal ovulatory cycling, decreases IR, increases basal metabolic rate, and ameliorates the clinical consequences metabolic syndrome. The decrease in energy intake should be coupled with a significant increase in energy expenditure by aerobic exercise. It was shown that BMR in women with PCOS was increased after a 12-week period of endurance and resistance exercise followed by a trend toward an improved hormonal profile (32). In addition, insulin sensitizers can be very helpful, particularly in obese PCOS women with IR (33). Administration of insulin sensitizers should always be coupled with low-caloric diet and lifestyle change.

In conclusion, women with PCOS, particularly those with IR, present a significantly decreased basal metabolic rate and should restrict their energy intake by diet and enhance their energy expenditure by exercise to maintain their body weight. Weight reduction is a gold standard in the management of obese PCOS. Every attempt to decrease body weight, either by diet alone or by diet and medication, must include a serious reduction in daily caloric intake, especially as derived from carbohydrates, and a significant increase in daily aerobic exercise.

REFERENCES

1. Urbanek M, Du Y, Silander K, Collins FS, Steppan CM, Strauss JF, et al. Variation in resistin gene promoter not associated with polycystic ovary syndrome. Diabetes 2003;52:214–7.
2. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. Lancet 2007;25;370(9588):685–97.
3. Acien P, Quereda F, Matallin P, Villarroya E, Lopez-Fernandez JA, Acien M, et al. Insulin, androgens and obesity in women with and without polycystic ovary syndrome: a heterogeneous group of disorders. Fertil Steril 1999;72:32–40.
4. Pasquali R, Gambineri A, Biscotti D, Vicennati V, Gagliardi L, Colitta D, et al. Effect of long-term treatment with metformin added to hypocaloric diet on body composition, fat distribution, and androgen and insulin levels in abdominally obese women with and without PCOS. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:2767–74.
5. Morales AJ, Laughlin GA, Bótzow T, Maheshwari H, Baumann G, Yen SS. Insulin, somatotropic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common and distinct features. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:2854–64.
6. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. Endocr Rev 1997;18:774–800.
7. Ovalle F, Azziz R. Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. Fertil Steril 2002;77:1095–105.
8. Weyer C, Pratley RE, Salbe AD, Bogardus C, Ravussin E, Tataranni PA. Energy expenditure, fat oxidation, and body weight regulation: a study of metabolic adaptation to long-term weight change. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:1087–94.
9. Haliday D, Hesp R, Stalley SF, Warwick P, Altman DG, Garrow JS. Resting metabolic rate, weight, surface area and body composition in obese women. Int J Obesity 1979;3:1–6.
10. Bray G, Schwartz M, Rozin R, Lister J. Relationships between oxygen consumption and body composition in obese patients. Metabolism 1970;19:418–29.
11. James WPT, Davies HL, Bailes J, Dauncey MJ. Elevated metabolic rates in obesity. Lancet 1978;1:1122–5.
12. Ravussin E, Burnard B, Schutz Y, Jequier E. Twenty four hour energy expenditure and resting metabolic rate in obese, moderately obese, and control subjects. Am J Clin Nutrit 1982;35:566–73.
13. Ravussin E, Lillioja S, Knowler WC, Christin L, Freymond D, Abbott WG, et al. Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain. N Engl J Med 1988;318:467–72.
14. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group 2004. Revised 2003 consensus on the diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2003;81:19–25.
15. Ferrannini E. The theoretical basis of indirect calorimetry: a review. Metabolism 1988;37:287–301.
16. Hume R. Prediction of lean body mass from height and weight. J Clin Pathol 1966;19:389–91.
17. Mathews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assesment: insulin resistance and B cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 1985;28:412–9.
18. Carmina E, Lobo RA. Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2004;82:661–5.

19. Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. Diabetes Care 1994;17: 152–4.
20. de Luis DA, Aller R, Izaola O, Gonzalez Sagrado M, Conde R. Resting energy expenditure, cardiovascular risk factors and insulin resistance in obese patients. Ann Nutr Metab 2005;49:381–5.
21. Segal KR, Dunaif A. Resting metabolic rate and postprandial thermogenesis in polycystic ovarian syndrome. Int J Obes 1990;559–67.
22. Robinson S, Chan SP, Spacey S, Anyaoku V, Johnston DG, Franks S. Postprandial thermogenesis is reduced in polycystic ovary syndrome and is associated with increased insulin resistance. Clin Endocrinol (Oxf) 1992;36:537–43.
23. Shetty PS, Jung RT, James WPT, et al. Postprandial thermogenesis in obesity. Clin Sci 1981;60:519–25.
24. Jebb SA, Prentice AM. Assessment of human energy balance. J Endocrinol 1997;155:183–5.
25. Tomten SE, Hostmark AT. Energy balance in weight stable athletes with and without menstrual disorders. Scand J Med Sci Sports 2006;16: 127–33.
26. Lebenstedt M, Platte P, Pirke KM. Reduced resting metabolic rate in athletes with menstrual disorders. Med Sci Sports Exerc 1999;31: 1250–6.
27. Day DS, Gozansky WS, Van Pelt RE, Schwartz RS, Kohrt WM. Sex hormone suppression reduces resting energy expenditure and {beta}-adrenergic support of resting energy expenditure. J Clin Endocrinol Metab 2005;906:3312–7.
28. Ibánez L, Potau N, Francois I, de Zegher F. Precocious pubarche, hyperinsulinism, and ovarian hyperandrogenism in girls: relation to reduced fetal growth. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:3558–62.
29. Walker CG, Zariwala MG, Holness MJ, Sugden MC. Diet, obesity and diabetes: a current update. Clin Sci (Lond) 2007;112:93–111.
30. Braun B, Zimmermann MB, Kretchmer N. Relationships between glucose metabolism and thermogenesis with and without prior exercise in obese women with noninsulin-dependent diabetes mellitus. Metabolism 1996;45:747–52.
31. Gumbiner B, Thorburn AW, Henry RR. Reduced glucose-induced thermogenesis is present in noninsulin-dependent diabetes mellitus without obesity. J Clin Endocrinol Metab 1991;72:801–7.
32. Bruner B, Chad K, Chizen D. Effects of exercise and nutritional counceling in women with polycystic ovary syndrome. Appl Physiol Nutr Metab 2006;4:384–91.
33. Moran L, Norman RJ. Understanding and managing disturbances in insulin metabolism and body weight in women with polycystic ovary syndrome. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004;18:719–36.

Association of the 17-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene polymorphism (−71A/G HSD17B5 SNP) with hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome (PCOS)

Dimitra J. Marioli, M.Sc.,[a,b] *Alexandros D. Saltamavros, M.D.,*[a,b] *Vasiliki Vervita, M.D.,*[a,b] *Vasiliki Koika, Ph.D.,*[a,b] *George Adonakis, M.D.,*[a,b] *George Decavalas, M.D.,*[b] *Kostas B. Markou, M.D.,*[c] *and Neoklis A. Georgopoulos, M.D.*[a,b]

[a] Division of Reproductive Endocrinology, [b] Department of Obstetrics and Gynecology, and [c] Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, University of Patras Medical School, University Hospital, Patras, Greece

Objective: To evaluate the association of an activating single-nucleotide polymorphism (SNP) at position −71 of the promoter of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene (−71A/G HSD17B5 SNP) and polycystic ovary syndrome (PCOS) in a well characterized cohort of caucasian PCOS women with biochemical hyperandrogenemia.

Design: The PCOS patients and unrelated healthy control subjects were genotyped for the −71A/G HSD17B5 SNP. The acquired genotypic data was tested for association with PCOS and other quantitative phenotypic traits of the syndrome in PCOS patients.

Setting: Subjects were recruited from the Division of Reproductive Endocrinology, Department of Obstetrics and Gynecology, at the University Hospital of Patras, Greece. Genotyping and biochemical determinations took place at the Laboratory of Molecular Endrocinology, University of Patras Medical School, Rion, Greece.

Patient(s): Participants comprised 150 caucasian Greek PCOS women with biochemical hyperandrogenism and chronic anovulation and polycystic ovarian morphology on ultrasound and 51 healthy control subjects.

Main Outcome Measure(s): HSD17B5 genotype, serum testosterone, serum androstenedione.

Result(s): No association of the −71A/G HSD17B5 SNP with PCOS was detected. However, the −71G HSD17B5 variant was associated with increased serum testosterone levels and decreased androstenedione/testosterone ratio.

Conclusion(s): The −71G HSD17B5 variant is not a major component of the molecular pathogenetic mechanisms of PCOS, although it might contribute to the severity of hyperandrogenemia in women with PCOS and biochemical hyperandrogenism. (Fertil Steril® 2008;■:■–■. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Polycystic ovary syndrome, PCOS, 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type V gene, HSD17B5 gene polymorphisms

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrinopathy of reproductive-age women, affecting 6%–10% of the population (1), and the leading cause of infertility in women (2). Polycystic ovary syndrome is characterized by hirsutism, anovulation, clinical and/or biochemical hyperandrogenism, and polycystic ovaries on ultrasonography (3). It is considered to be a complex syndrome in terms of clinical presentation and genetics, with serious long-term effects on health (2). Family aggregation of hyperandrogenism implies a genetic compound of functional hyperandrogenism and PCOS (4–7). Therefore, research in the field has long been focused on identifying genomic variants of the enzymes involved in testosterone biosynthesis, because it is considered to be the major circulating androgen.

17β-Hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (HSD17B5; or AKR1C3, MIM 603996) is a member of the aldo-keto reductase superfamily comprising several multifunctional enzymes that differ in both their tissue specific expression profiles and their substrate specializations (8). It is the enzyme responsible for reduction of androstenedione (A) to testosterone (T) in theca ovarian cells and adrenals, the main sources of T in women (8, 9).

Recently, a new functional polymorphism, at position −71 of the HSD17B5 promoter (single-nucleotide polymorphism [SNP] ID: rs3763676), was reported to be associated with both PCOS and higher T levels (8). However, later studies showed lack of replication of the reported association with hyperandrogenemia in women with PCOS (9) and in girls with precocious pubarche (10).

The aim of the present study was to evaluate the association of the −71A/G SNP of HSD17B5 and PCOS in a well

Received April 5, 2008; revised June 2, 2008; accepted June 9, 2008.
D.M. has nothing to disclose. A.S. has nothing to disclose. V.V. has nothing to disclose. V.K. has nothing to disclose. G.A. has nothing to disclose. G.D. has nothing to disclose. K.M. has nothing to disclose. N.G. has nothing to disclose.
Reprint requests: Neoklis A. Georgopoulos, Division of Reproductive Endocrinology, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Patras Medical School, University Hospital, 26500 Patras, Greece (FAX: +302610993982; E-mail: neoklisg@hol.gr).

Copyright ©2008 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

characterized cohort composed of 150 hyperandrogenic PCOS women and 51 unrelated healthy control subjects.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The study included 150 caucasian Greek women with PCOS with a mean age of 22.64 ± 0.44 years and a mean body mass index (BMI) of 25.73 ± 0.64 kg/m^2. The control group included 51 regularly menstruating women with a mean age of 22.91 ± 1.5 years and a mean BMI of 21.191 ± 2.5 kg/m^2, which was not significantly different from the PCOS group. All control subjects had normal ovulating cycles with serum P >10 ng/mL in the luteal phase of the menstrual cycle and no signs of clinical hyperandrogenism. Diagnosis of PCOS was based on the simultaneous presence of biochemical hyperandrogenism, which was defined as increased serum T and/or increased free androgen index, chronic anovulation, and polycystic ovarian morphology on ultrasound, thus meeting the criteria of both Rotterdam European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE)/American Society for Reproductive Medicine (ASRM) 2003 (3) and National Institutes of Health/National Institute of Child Health and Human Development 1990 (11) guidelines.

Exclusion criteria were congenital adrenal hyperplasia, androgen-secreting tumors, and Cushing syndrome. All subjects had normal thyroid, kidney, and liver function.

All subjects gave written informed consent, and the study was performed according to the guidelines of the Institutional Review Board of the University of Patras Medical School.

METHODS

Physical measurements included weight, height, fat-free mass, fat mass, systolic and diastolic blood pressure, and resting heart rate. Biochemical parameters included the serum T, free T, A, total cholesterol, triglycerides, high-density and low-density lipoprotein cholesterol, and glucose levels. A standard oral glucose tolerance test (OGTT) with 75 g glucose was carried out. Insulin resistance was assessed by determining fasting insulin levels, fasting glucose levels, the fasting glucose/insulin ratio, the homeostasis model assessment (HOMA) index, and quantitative insulin-sensitivity check index (QUICKI), as well as the area under curve (AUC) for the OGTT-derived insulin and glucose values.

All assays for hormonal determinations were performed by electrochemiluminescence quantitation (Elecsys 2010; Roche Diagnostics, Laval, Quebec) with the exception of serum A and 17-OH progesterone, which were determined by radioimmunoassay using commercially available kits (BioSource, Nivelles, Belgium).

Genotyping

Genomic DNA was extracted from whole peripheral blood by the standard method of phenol/chloroform. All DNA samples were genotyped by a two-step polymerase chain reaction introducing a restriction site as previously described (8). Oligonucleotide primers were synthesized by VBC-Genomics Bioscience Research, Vienna.

Statistical Analysis

The genotype frequency distributions were tested for Hardy-Weinberg equilibrium and compared with the genotype frequencies in a group of normal subjects by chi-squared tests. The independent-sample *t* test, with two-tailed test of statistical significance, and the Levene test for equality of variances were used to assess the power of all relationships. Correlations with a critical value of $P<.05$ were considered to be significant. All statistical procedures were performed using SPSS 11.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Genotype frequencies of the HSD17B5 gene polymorphism (−71A/G HSD17B5 SNP) are presented in Table 1. No association of the −71A/G SNP with PCOS was detected.

Clinical and biochemical features of the study cohort are presented in Table 2. All statistical procedures were performed between the AA and AG genotypic subgroups, because the GG group was too small to provide statistical power. Therefore, *P* values presented in Table 2 refer to correlations between −71AA and −71AG HSD17B5 genotypes only.

The promoter variant −71AG genotype was associated with increased serum T levels ($P=.031$) and decreased A/T ratio ($P=.018$) compared with the promoter −71AA genotype (Fig. 1). Concerning the promoter −71GG genotype, no statistical significance was noted, owing to the small number of patients, although a clear tendency for even higher serum T levels and even lower A/T ratio was observed.

TABLE 1

Genotype frequencies of the 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 −71A/G gene polymorphism (−71A/G HSD17B5 SNP) in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) and biochemical hyperandrogenemia and in the control group of normal menstruating women.

Genotype	PCOS (%)	Control (%)	*P* value
AA	63.28% n = 95	62.7% n = 32	.726 (NS)
AG	30.47% n = 45	35.3% n = 18	.727 (NS)
GG	6.25% n = 10	2% n = 1	[a]

[a] Too few samples to perform statistical analysis.

Marioli. HSD17B5 polymorphism (−71A/G SNP) in PCOS. Fertil Steril 2008.

TABLE 2

Clinical characteristics in polycystic ovary syndrome (PCOS) women according to different genotyps at position −71 of the promoter of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene.

	PCOS Total	AA	AG	GG	*P* value
Age (yrs)	22.90 ± 0.46	22.72 ± 0.53	22.61 ± 0.87	21.88 ± 1.64	.907
Body mass index (kg/m^2)	26.04 ± 0.67	25.65 ± 0.76	26.06 ± 1.22	25.08 ± 3.92	.776
Fasting insulin (μIU/mL)	17.7 ± 0.70	20.10 ± 2.72	17.66 ± 3.80	9.60 ± 2.45	.605
Fasting glucose/fasting insulin	11.54 ± 0.80	11.91 ± 1.34	12.05 ± 2.16	12.62 ± 2.84	.957
HOMA index	76.69 ± 6.43	80.73 ± 9.66	77.85 ± 13.02	84.13 ± 18.21	.861
QUICKI	0.355 ± 0.00	0.358 ± 0.00	0.356 ± 0.00	0.364 ± 0.01	.840
Testosterone (ng/mL)	0.75 ± 0.18	0.72 ± 0.44	0.88 ± 0.06	0.90 ± 0.17	.035
Free testosterone (pg/mL)	3.02 ± 0.17	2.94 ± 0.17	3.14 ± 0.36	2.77 ± 0.53	.576
17-OH progesterone (ng/mL)	1.24 ± 0.12	1.21 ± 0.08	1.22 ± 0.14	1.29 ± 0.22	.951
Androstenedione (ng/mL)	3.30 ± 0.13	3.36 ± 0.14	3.23 ± 0.25	2.62 ± 0.33	.649
Androstenedione/testosterone	5.63 ± 0.15	5.93 ± 0.53	4.28 ± 0.44	4.09 ± 1.06	.018
Free androgen index.	0.69 ± 0.15	0.74 ± 0.20	0.69 ± 0.10	0.54 ± 0.13	.857

Note: Values are mean ± SD. *P* values are between AA and AG variants. HOMA = homeostasis model assessment; QUICKI = quantitative insulin-sensitivity check index.

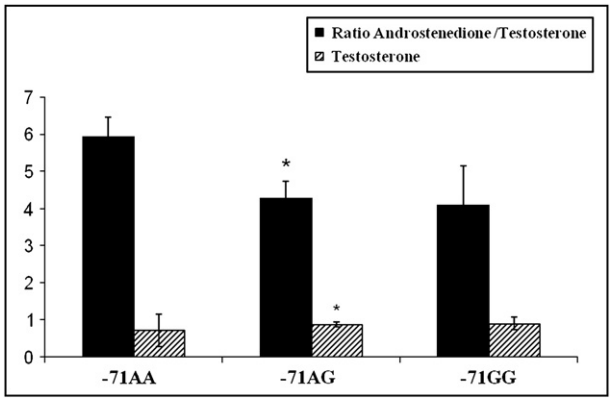
Marioli. HSD17B5 polymorphism (−71A/G SNP) in PCOS. Fertil Steril 2008.

DISCUSSION

Polycystic ovary syndrome is considered to be a disorder of ovarian androgen excess, and there is mounting evidence that abnormal steroidogenesis in PCOS results primarily from an intrinsic theca cell abnormality of genetic etiology (7). Consequently, genes encoding the enzymes involved in ovarian steroidogenesis are considered to be candidate susceptibility loci both for hyperandrogenism and PCOS.

FIGURE 1

The promoter variant −71AG genotype was associated with increased serum testosterone levels (*P*=.031) and with decreased androstenedione/testosterone ratio (*P*=.018) compared with the promoter −71AA genotype in women with polycystic ovary syndrome. Regarding the promoter −71GG genotype, no statistical significance was noted, owing to the small number of patients. Values are mean ± SD. *$P<.05$



Marioli. HSD17B5 polymorphism (−71A/G SNP) in PCOS. Fertil Steril 2008.

In the present study, we addressed the question whether the −71A/G HSD17B5 SNP is related to PCOS and hyperandrogenemia in a distinct phenotypic group of caucasian PCOS patients characterized by biochemical hyperandrogenemia and chronic anovulation and polycystic ovaries on ultrasound. The group of PCOS women included in the present study is homogeneous regarding the clinical phenotype, namely, the presence of biochemical hyperandrogenemia, and therefore appropriate for this genetic-phenotypic association study of a gene polymorphism previously reported to be capable of modifying serum androgen levels (8). Our results are partly in accordance and partly in discordance with previously reported case-control studies (8–10).

In PCOS, most genetic association studies show a lack of replication between different ethnic groups, a global problem concerning not only PCOS but other complex traits as well. As far as PCOS is concerned, the observed lack of replication in association studies seems to be due to two major compounds: 1) phenotypic heterogeneity within PCOS patients; and 2) statistical errors leading to false negative/positive results.

Polycystic ovary syndrome encompasses a broad spectrum of phenotypes, which obscures diagnosis and prompts controversy in clinical endocrinology regarding definition and diagnosis of the syndrome (11). At present, diagnosis of PCOS is based on the revised consensus criteria of Rotterdam ESHRE/ASRM 2003 (3). The revised criteria include two additional phenotypes, namely, those with menstrual irregularities and polycystic ovarian morphology on ultrasonography and those with clinical and/or biochemical hyperandrogenism and polycystic ovarian morphology on ultrasonography, for which there has been increasing evidence over the last few

years that they represent milder forms of the syndrome (12, 13). On the contrary, the phenotypes that include hyperandrogenism and chronic anovulation appear to be the most seriously affected on the basis of androgen levels, insulin resistance, and obesity (13).

Thus, genetic studies conducted by different researchers encompass different phenotypic subgroups, a policy that complicates the identification of genomic variants that exert modest or minor effect on specific quantitative phenotypic traits such as hyperandrogenemia.

The −71A/G HSD17B5 SNP was identified for the first time by Qin et al. (8) in a patient with hyperthecosis who was homozygous for the G variant and showed a frankly male phenotype in the GnRH agonist test. The −71G HSD17B5 variant proved to be a polymorphism after genotyping 121 subjects with PCOS and 128 general population subjects. Further analysis of the acquired data revealed an association of the G variant with higher serum T levels and PCOS. Subsequent functional in vitro assays indicated that the underlying molecular mechanism is a modest increase in the expression of HSD17B5 gene due to higher affinity of the G variant for the transcription factors Sp1/Sp3 (8).

Goodarzi et al. (9), in an attempt to replicate the reported association by Qin et al., genotyped white PCOS women for the −71A/G HSD17B5 SNP and five other SNPs spanning the entire gene of HSD17B5. However, neither the association of the −71G variant with PCOS nor its association with higher T levels was confirmed. The same negative associations, concerning all known SNPs of the HSD17B5 gene, have been reported by Petry et al. (10) in girls with premature pubarche, which can be viewed as a forerunner of PCOS.

The discrepancy between Qin et al.'s reported association of the −71G variant with PCOS and the present results might be mainly due to population stratification. Population stratification arises because of the admixture of populations with variations in allele frequencies and different rates of disease and/or different average trait values in a single study (14, 15). Thanks to these differences in average phenotypes among populations, caucasians overall represented a disproportionate fraction of individuals with low traits in Qin et al.'s study (8).

To avoid detection of systematic differences in ancestry rather than association of genes with disease, case and control subjects should be carefully matched on the basis of genetic background. Yet Qin et al. based their study on case and control groups of different composition. Moreover, African Americans comprise a group with intrinsic heterogeneous ancestral background (16) that might lead to cryptic population stratification. This is the reason that even small-sample studies are worthwhile in ethnically homogeneous populations when trying to elucidate different SNPs associations with complex genetic traits.

Despite the differences in allelic frequencies and average phenotypes between populations of different ancestry, the phenotypic impact of a certain gene and the underlying genetic basis of a disease are expected to be the same. Therefore, the association of serum T levels with the −71G variant indeed seems to be true positive.

Our results are mainly in accordance with Goodarzi et al. (9), who also found no association with the −71HSD17B5 G variant and PCOS. If such an association existed, it would have been more evident in a homogeneous ethnic caucasian population of women with PCOS and hyperandrogenism, because the −71G HSD17B5 variant modulates T production. Therefore, the results of the present study confirm the earlier report that the polymorphism can not play a major role in the genetic pathogenesis of PCOS. According to the Androgen Excess Society statement, free T is the most valuable serum androgen in terms of clinical significance (17). The −71G variant is capable of modifying the circulating serum levels of total T, which is derived from the conversion of A. Therefore, its clinical significance might be minor, because free T represents only 2% of total serum T. Nevertheless, Qin et al. (8) reported that the polymorphism might be responsible for a 20% increase in total serum T values. Concerning the positive association of the −71G HSD17B5 variant with higher T levels, Goodarzi et al. (9) correctly did not replicate it, because their group of PCOS patients included more than one phenotypic subtype regarding hyperandrogenism. According to the criteria used by Goodarzi et al., PCOS definition encompasses women with clinical and/or biochemical hyperandrogenism and menstrual irregularities. Eventually, the group of PCOS women with clinical and not biochemical hyperandrogenism included in Qin et al.'s cohort (8) might contribute to the reported lack of association, which in order to be expressed might need the increased androgen substrate.

Our results point out the significance of the classification of PCOS patients into discrete subsets in the elucidation of the molecular mechanisms underlying quantitative traits of the syndrome. Taking into account all three studies, it can be stated that the −71G HSD17B5 variant is not a major component of the molecular pathogenetic mechanisms of PCOS, yet it contributes to the severity of hyperandrogenemia in PCOS patients with biochemical hyperandrogenism. Additionally, in women with PCOS an increased serum A is frequently reported and, therefore, an increased substrate for T production. Thus, the clinical significance of the polymorphism is more important for women with PCOS compared with normal nonhirsute women. The same effect was reported with CYP11a 5′-UTR $(tttta)_n$ variants, which were elevated in PCOS women but not in healthy controls (18). Therefore, the increased androgen production by theca cells could be attributed to transcriptional dysregulation of the enzymes involved in steroidogenesis (19) driven by the interaction of altered hormonal profile and multiple genetic variants, each one exerting modest phenotypic effects.

In conclusion, the −71G HSD17B5 variant is not a major component of the molecular pathogenetic mechanisms of PCOS, yet it might contribute to the severity of hyperandrogenemia in women with PCOS and biochemical hyperandrogenism.

Acknowledgments: The authors thank Dr. G. Sakellaropoulos, Assistant Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine, University of Patras, for advice on statistical analysis of the data.

REFERENCES

1. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovarian syndrome in an unselected population. J Clin Endocrinol Metab 2004;98:2745–9.
2. Carmina E, Lobo RA. Polycystic ovary syndrome (PCOS): arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:1897–9.
3. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group 2004. Revised 2003 consensus on the diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2003;81:19–25.
4. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, San Millan JL. The molecular genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. Endocr Rev 2005;26:251–82.
5. Azziz R, Kashar-Miller MD. Family history as a risk factor for the polycystic ovary syndrome. J Pediatr Endocrinol Metab 2000;13:1303–6.
6. Kashar-Miller M, Azziz R. Heritability and the risk of developing androgen excess. J Steroid Biochem Mol Biol 1999;69:261–8.
7. DiamantiKantarakis E, Piperi C. Genetics of polycystic ovary syndrome: searching the way out of the labyrinth. Hum Reprod 2005;11:631–43.
8. Qin K, Ehrmann DA, Cox N, Refetoff S, Rosenfield RL. Identification of a functional polymorphism of the human type 5 17β-hydroxysteroid dehydrogenase gene associated with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:270–8.
9. Goodarzi MO, Jones MR, Antoine HJ, Pall M, Chen YI, Azziz R. Non-replication of the type 5 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase gene association with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrin Metab 2008;93:300–3.
10. Petry CJ, Ong KK, Wingate DL, Zegher F, Ibanez L, Dunger DB. Lack of association between common polymorphisms in the 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type V gene (HSD17B5) and precocious pubarche. J Steroid Biochem Mol Biol 2007;105:176–80.
11. Zawadski JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: toward a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR, eds. Polycystic ovary syndrome. Boston: Blackwell Scientific, 1992:377–84.
12. Azziz R. Controversy in clinical endocrinology. Diagnosis of polycystic ovarian syndrome: the Rotterdam criteria are premature. J Clin Endocrin Metab 2006;91:781–5.
13. Welt CK, Gudmundsson JA, Arason G, Adams J, Palsdottir H, Gudlaugsdottir G, et al. Characterizing different subsets of polycystic ovary syndrome as defined by the Rotterdam criteria: the impact of weight on phenotype and metabolic features. J Clin Endocrin Metab 2006;91:4842–8.
14. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. Lancet 2003;361:598–604.
15. Freeman ML, Reich D, Penney KL, MacDonald GJ, Mignault AA, Patterson N, et al. Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. Nat Genet 2004;36:388–93.
16. Keita S, Kittles RA, Royal CD, Bonney GE, Fuurbert-Harris P, Dunston GM, et al. Conceptualizing human variation. Nat Genet 2004;36(Suppl):517–20.
17. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, DiamantiKandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W. et al. Position statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. J Clin Endocrinol Metab 91:4237–45.
18. DiamantiKantarakis E, Bartzis MI, Bergiele AT, Tsianateli TC, Kouli CR. Microsatellite polymorphism $(tttta)_n$ at -528 base pairs of gene CYP11α influences hyperandrogenemia in patients with polycystic ovarian syndrome. Fertil Steril 2000;73:735–45.
19. Ehrmann DA, Barnes BB, Rosenfield Rl. Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. Endocr Rev 1995;16:322–53.