

Streszczenie

Zespół policystycznych jajników (*polycystic ovary syndrome*, PCOS) jest jednym z najczęstszych schorzeń endokrynologicznych dotyczącym nawet do 10% kobiet w wieku reprodukcyjnym. PCOS poza zaburzeniami miesiączkowania i hiperandrogenizmem wiąże się z częstszym występowaniem zaburzeń metabolicznych jak insulinooporność (*insulin resistance*, IR), otyłość brzuszna czy dyslipidemia aterogenna. Patogeneza PCOS i związanych z zespołem zaburzeń nie jest do końca wyjaśniona. Dotychczasowe badania wskazują na współistnienie z PCOS przewlekłego stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia. Przypuszcza się, że zapalenie może być immanentną składową PCOS, nie tylko wynikającą ze współistniejących z zespołem zaburzeń metabolicznych.

Kluczową rolę w przebiegu reakcji zapalnej odgrywają receptory Toll-like (TLR). Receptory TLR stanowią pierwszą linię obrony przed inwazją drobnoustrojów. Ich pobudzenie indukuje szlaki sygnałowe prowadzące do produkcji cytokin prozapalnych, w tym IL-6 i TNF- α . Ostatnie doniesienia wiążą nadmierną aktywację TLR (szczególnie podtypów 2 i 4) z otyłością, IR i zaburzeniami metabolicznymi - schorzeniami, które często współwystępują z PCOS. Ponadto, badania dowodzą nadekspresji TLR2 i TLR4 u pacjentek z PCOS. Zjawisko to jest niezależne od otyłości i wskazuje na udział innych czynników patogenetycznych w rozwoju zapalenia u kobiet z PCOS.

Celem pracy było ustalenie czy pacjentki z PCOS charakteryzują się częstszym występowaniem określonych polimorfizmów genów TLR2 i TLR4, a także większym stężeniem prozapalnych cytokin w porównaniu do zdrowych kobiet z grupy kontrolnej.

Materiał: Do badania zakwalifikowano 78 kobiet w wieku od 19 do 39 lat. Grupę badaną stanowiło 40 kobiet, hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami we Wrocławiu. Rozpoznanie PCOS ustalono w oparciu o kryteria rotterdamskie. Pacjentki prezentowały fenotyp A, czyli spełniały wszystkie trzy kryteria niezbędne do rozpoznania zespołu. Grupa kontrolna obejmowała 38 kobiet, prawidłowo miesiączkujących.

Metody: U wszystkich kobiet przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe z oceną parametrów antropometrycznych. Dokonano oceny biochemicznej (stężenia glukozy i insuliny na czczo i w teście doustnego obciążenia

glukozą, SHBG, lipidogram) oraz hormonalnej (stężenia testosteronu, androstendionu, LH, FSH). Na podstawie uzyskanych wyników obliczono wskaźnik wolnych androgenów (*free androgen index*, FAI) oraz pośrednie wskaźniki insulinooporności (HOMA-IR, QUICKI, Matsudy). Stężenia cytokin prozapalnych (IL-6 i TNF- α) oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA). U wszystkich kobiet z krwi obwodowej wyizolowano genomowe DNA. Przy użyciu techniki PCR i metody minisekwencjonowania zbadano polimorfizmy genu TLR2 (rs3804099, rs3804100 i rs5743708) oraz TLR4 (rs4986790 i rs4986791). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Wartości $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

Wyniki: Kobiety z PCOS charakteryzowały się istotnie większymi wartościami BMI, WHR a także większym obwodem talii. Nie obserwowano różnic w zakresie wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego między grupami. W grupie pacjentek z PCOS stwierdzono istotnie większe stężenie insuliny na czczo oraz insuliny i glukozy w 120 minucie OGTT. Nie wykazano istotnych różnic w stężeniu glukozy na czczo pomiędzy grupami. Wartości wskaźników IR - QUICKI i Matsudy były istotnie mniejsze, a HOMA-IR większe w grupie kobiet z PCOS. Pacjentki z PCOS odznaczały się ponadto znacząco mniejszym stężeniem cholesterolu HDL ($p < 0,001$) oraz większym stężeniem trójglicerydów ($p < 0,001$). Nie obserwowano różnic istotnych statystycznie w zakresie stężenia cholesterolu frakcji LDL i cholesterolu całkowitego między grupami.

Pacjentki z PCOS charakteryzowały się znacząco większym stężeniem testosteronu całkowitego, androstendionu oraz wartością FAI ($p < 0,0001$).

W grupie kobiet z PCOS stwierdzono znacząco większą liczbę WBC ($p < 0,0001$), stężenia CRP ($p < 0,05$) oraz IL-6 ($p < 0,001$). Stężenie TNF- α było z kolei istotnie statystycznie mniejsze w grupie PCOS ($p < 0,05$). Wykazano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem IL-6 a liczbą WBC, stężeniami CRP i glukozy na czczo. Korelacja pomiędzy IL-6 a BMI oraz wskaźnikami IR pozostawała na granicy istotności statystycznej. Stężenie TNF- α było ujemnie skorelowane ze stężeniem SHBG.

Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmów genu TLR2 (rs3804099, rs3804100 oraz rs5743708) nie różniła się istotnie pomiędzy grupami. Różnica w częstości genotypów polimorfizmów genu TLR4 (rs4986790 i rs4986791) była natomiast bliska granicy istotności statystycznej ($p = 0,08$). Dodatkowo wykazano silną korelację we współwystępowaniu obu polimorfizmów

genu TLR4. Podobna zależność dotyczyła polimorfizmów rs3804099 i rs3804100 genu TLR2.

W grupie kobiet z PCOS nie wykazano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy poszczególnymi polimorfizmami genu TLR2 i TLR4 a parametrami antropometrycznymi i metabolicznymi. Aczkolwiek związek pomiędzy stężeniem HDL a polimorfizmem rs3804100 TLR2 był bliski granicy istotności statystycznej ($p=0,05$). Na granicy istotności była również korelacja pomiędzy polimorfizmem rs5743708 genu TLR2 a stężeniem CRP ($p=0,06$). Analizując korelacje pomiędzy polimorfizmami TLR2 i TLR4 a parametrami hormonalnymi stwierdzono istotną zależność pomiędzy dwoma polimorfizmami TLR4 (rs4986790 i rs4986791) jak i polimorfizmem rs3804100 genu TLR2 a stężeniem FSH. Korelacja pomiędzy polimorfizmem rs3804099 genu TLR2 a stężeniem androstendionu była na granicy istotności statystycznej ($p=0,08$).

Wnioski: Kobiety z PCOS różnią się profilem metabolicznym, hormonalnym i parametrami antropometrycznymi w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej. Częściej stwierdza się u nich otyłość typu brzuszego oraz IR. Pacjentki z PCOS odznaczają się większym stężeniem IL-6, które najpewniej wynika z towarzyszących zespołowi zaburzeń metabolicznych aniżeli jest składową PCOS *per se*. Przypuszcza się, że badane polimorfizmy genu TLR4 mogą odgrywać rolę w etiopatogenezie PCOS. Potrzeba jednak dalszych badań na większej ilościowo grupie pacjentek. Nie potwierdzono związku pomiędzy polimorfizmami genu TLR2 a PCOS. Polimorfizm w zakresie genów receptora TLR2 jest związany ze stężeniem androstendionu zarówno w grupie kobiet z PCOS jak i bez tego zespołu. Potwierdza to udział tego receptora

w rozwoju hiperandrogenemii u kobiet, niezależnie od PCOS. Prawdopodobnie oba polimorfizmy genu TLR4 oraz rs3804100 TLR2 są również związane z procesem owulacji. Polimorfizm rs3804100 TLR2 odgrywa ponadto rolę w procesie aterogenezy a obecność allele C pełni funkcję ochronną przed rozwojem miażdżycy. Badanie tego polimorfizmu może w przyszłości pomóc w wyodrębnieniu grupy chorych wymagających szczególnego monitorowania pod kątem rozwoju miażdżycy.

8. Summary

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders, affecting up to 10% of reproductive-aged women. PCOS is associated with hyperandrogenism and the higher rate of menstrual and metabolic disorders, e.g. insulin resistance (IR), abdominal obesity or dyslipidemia. The pathogenesis of PCOS and accompanying disorders is not yet fully explained. Previous studies indicated the coexistence of PCOS and low-grade chronic inflammation. This inflammation is considered to be an immanent component of PCOS, not only resulting from metabolic disorders that accompany the syndrome.

Toll-like receptors (TLRs) play a key role in the course of inflammatory reactions. TLRs are the first line of defense against microbial invasion. Their stimulation induces signaling pathways leading to the production of proinflammatory cytokines, including IL-6 and TNF- α . Recent reports have linked excessive activation of TLR, particularly subtypes 2 and 4, to obesity, IR and metabolic disorders - diseases that often co-exist with PCOS. In addition, studies prove the overexpression of TLR2 and TLR4 in PCOS patients. This phenomenon is independent of obesity, which indicates the involvement of other pathogenic factors in the development of inflammation in women with PCOS.

The study aim was to determine whether PCOS patients characterized by a higher rate of specific TLR2 and TLR4 genes polymorphisms, as well as the higher proinflammatory cytokines concentration, in comparison to healthy women of the control group.

Material: 78 women aged between 19 and 39 were qualified for the study. The study group consisted of 40 women, hospitalized in the Department of Endocrinology, Diabetes and Isotope Treatment in Wrocław. Diagnosis of PCOS based on the Rotterdam criteria. Patients exhibited the phenotype A, i.e. they met all three criteria required to recognize the syndrome. Control group comprised of 38 correctly menstruating women.

Methods: All subjects underwent: a physical examination - assessing their anthropometric parameters; biochemical assessments - tests for fasting glucose, insulin concentration, oral glucose, SHBG, lipid profile; hormonal assessments - tests for testosterone, androstenedione, LH, FSH levels. The free androgen index (FAI) and indirect insulin resistance indices (HOMA-IR, QUICKI, Matsuda) were calculated

based on the test results. The concentrations of proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Genomic DNA was isolated from all women's peripheral blood. The TLR2 gene polymorphisms (rs3804099, rs3804100 and rs5743708) and TLR4 (rs4986790 and rs4986791) were tested using PCR and the minisequencing method. Gathered results were analyzed statistically, with probability values over 0.05 being considered statistically significant.

Results: PCOS patients characterized by significantly higher values of BMI, WHR and waist circumference. There were no differences in the systolic and diastolic pressure values between the groups. Significantly higher fasting insulin, OGTT 120 minute insulin and OGTT 120 minute glucose levels were observed. There were no significant differences in fasting glucose concentration between the groups. When it comes to IR index values in the PCOS group - QUICKI 's and Matsuda's values were significantly lower, while HOMA-IR values were higher. Patients with PCOS also characterized by significantly lower HDL cholesterol ($p < 0.001$) and higher triglycerides ($p < 0.001$) concentrations. There were no statistically significant differences between LDL cholesterol and total cholesterol among groups.

Patients with PCOS were identified with significantly higher total testosterone, androstenedione and FAI ($p < 0.0001$) values.

Significantly higher concentrations of WBC ($p < 0.0001$), CRP ($p < 0.05$) and IL-6 ($p < 0.001$) were found in the PCOS group. The TNF- α concentration was statistically significantly lower in this group ($p < 0.05$). A positive correlation was found between IL-6 concentration and WBC, CRP and fasting glucose. The correlation between IL-6 and BMI and IR indices remained on the borderline of statistical significance. The TNF- α concentration had a negative correlation with the SHBG concentration.

The frequency of TLR2 gene polymorphisms individual genotypes (rs3804099, rs3804100 and rs5743708) did not differ significantly between the groups. On the other hand, the difference in the frequency of genotypes of TLR4 gene polymorphisms (rs4986790 and rs4986791) was close to the statistical significance level ($p = 0.08$). Moreover, a strong correlation was found in the coexistence of both TLR4 gene polymorphisms. A similar relationship was found in the rs3804099 and rs3804100 polymorphisms of the TLR2 gene.

In the PCOS group, there were no statistically significant correlations between individual TLR2/TLR4 polymorphisms and anthropometric/metabolic parameters. However, the relationship between HDL concentration and rs3804100 TLR2 polymorphism was close to the statistical significance level ($p = 0.05$). The correlation between the TLR2 gene rs5743708 polymorphism and the CRP concentration was also significant ($p = 0.06$). During statistical analysis of polymorphisms and hormonal parameters, a significant relationship between the two TLR4 polymorphisms (rs4986790 and rs4986791) was found, as well as in the TLR2 gene rs3804100 polymorphism and the concentration of FSH. The correlation between the TLR2 gene rs3804099 polymorphism and the androstenedione concentration was on the borderline of statistical significance ($p = 0.08$).

Conclusion: Women diagnosed with PCOS differ in their metabolic and hormonal profiles, as well as in anthropometric parameters, as compared to women in the control group. Visceral obesity and IR were observed more often in PCOS cases. They also exhibited a higher concentration of IL-6, which plausibly comes from metabolic disorders accompanying the syndrome, rather than being a component of PCOS *per se*. The polymorphisms of the studied TLR4 gene may play a role in the PCOS etiopathogenesis, although further research on a larger group of patients is required. The relationship between TLR2 gene polymorphisms and PCOS has not been proved. Polymorphism in the TLR2 receptor gene had relation to androstenedione in both, PCOS and non-PCOS, groups. This observation confirms the participation of the TLR2 receptor in the hyperandrogenemia development in women, regardless of PCOS. Probably both of the TLR4 gene polymorphisms and rs3804100 TLR2 are associated with the ovulation process. Moreover, the rs3804100 TLR2 polymorphism plays a role in the atherogenesis process, and the presence of the C allele plays a protective role against the development of atherosclerosis. Further studies of this polymorphism may in the future help identifying groups of patients requiring special monitoring for the atherosclerosis development.