

Gdański Uniwersytet Medyczny

Monika Kuligowska-Jakubowska

**„Ocena wpływu stosowania hormonalnych środków
antykoniecznych na wybrane czynniki ryzyka rozwoju
chorób układu sercowo-naczyniowego u kobiet
z zespołem wielotorbielowatych jajników”**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. n. med. Dominik Rachoń, prof. nadzw.

Zakład Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Pracę zrealizowano ze środków MNiSW (zadanie MN 01-0105/08)

Gdańsk 2016

Pragnę serdecznie podziękować:

*Promotorowi rozprawy doktorskiej Panu Profesorowi Dominikowi Rachoniowi
za inspirację, cenne wskazówki, poświęcony czas i życzliwą pomoc okazaną mi
na wszystkich etapach powstawania niniejszej pracy*

*Pani Profesor Katarzynie Zorenie, Panu Profesorowi Krzysztofowi Narkiewiczowi,
Pani Doktor Agnieszce Kowalewskiej - Włas, Doktor Ewie Wronie,
Doktorowi Robertowi Nowakowi za wszechstronne wsparcie i pomoc
na różnych etapach realizacji badań*

*Szczególnie dziękuję mojej Mamie,
mężowi Sławkowi i dzieciom Marcie, Emilce i Adamowi za ich cierpliwość i miłość*

LISTA SKRÓTÓW ZASTOSOWANYCH W PRACY

ADMA – (z ang. *asymmetric dimethyl-arginine*) asymetryczna dimetyloarginina

AE & PCOS – (z ang. *Androgen Excess and PCOS Society*) Towarzystwo Nadmiaru Androgenów i PCOS

ANDROST - androstendion

ASRM – (z ang. *American Society for Reproductive Medicine*) Amerykańskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu

BMI – (z ang. *body mass index*) wskaźnik masy ciała

BP – (z ang. *blood pressure*) ciśnienie tętnicze

CCRL2 – (z ang. *chemokine C-C motif receptor like 2*) receptor chemokinowy

ChNS – choroba niedokrwienna serca

CI – (z ang. *confidence interval*) przedział ufności

CLIA – (z ang. *chemiluminescence immunoenzymatic assay*) metoda immunoenzymatycznej chemiluminescencji

CMKLR-1 - (z ang. *chemokine-like receptor 1*) receptor chemokinowy

CPA – (z ang. *cyproterone acetate*) octan cyproteronu

CRP – (z ang. *C-reactive protein*) białko C-reaktywne

CS – (z ang. *calcium score*) wskaźnik uwapnienia tętnic wieńcowych

ChUSN – choroby układu sercowo-naczyniowego

DBP – (z ang. *diastolic blood pressure*) rozkurczowe ciśnienie tętnicze

DHEA-S – siarczan dehydroepiandrosteronu

DRSP – drospirenon

DŚA – doustne środki antykoncepcyjne

DTTG – doustny test tolerancji glukozy

ECLIA – (z ang. *electrochemiluminescence immunoenzymatic assay*) metoda immunoenzymatycznej elektrochemiluminescencji

EE – (z ang. *ethinylestradiol*) etynyloestradiol

EE+CPA - (z ang. *ethinylestradiol + cyproterone acetate*) doustny preparat antykoncepcyjny zawierający etynyloestradiol i octan cyproteronu

EE+DRSP – (z ang. *ethinylestradiol + drospirenone*) doustny preparat antykoncepcyjny zawierający etynyloestradiol i drospirenon

EKG – elektrokardiogram

ESHRE – (z ang. *European Society for Human Reproduction and Ebryology*) Europejskie Towarzystwo Rozrodczości Człowieka i Embriologii

FAI – (z ang. *free androgen index*) wskaźnik wolnych androgenów

FFA – (z ang. *free fatty acids*) wolne kwasy tłuszczowe

FGIR – (z ang. *fasting glucose to insulin ratio*) stosunek stężenia glukozy do stężenia insuliny w surowicy na czczo

FMD – (z ang. *flow-mediate dilation*) dylatacja tętnicy ramiennej indukowana niedokrwieniem

FSH – (z ang. *follicle-stimulating hormone*) hormon folikulotropowy

GDM – (z ang. *gestational diabetes mellitus*) cukrzyca ciążowa

GnRH – (z ang. *gonadotropin-releasing hormone*) gonadoliberyna

GPR 1 – (z ang. *G protein-coupled receptor*) receptor związany z białkiem G

HDL-Ch – (z ang. *high density lipoprotein cholesterol*) cholesterol frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości

HOMA-IR – (z ang. *homeostasis model assessment of insulin resistance*) wyliczony wskaźnik oporności tkanek na insulinę

HR – (z ang. *heart rate*) akcja serca

IDF – (z ang. *International Diabetes Federation*) Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna

IFG – (z ang. *impaired fasting glucose*) nieprawidłowa glikemia na czczo

IGF-1 – (z ang. *insulin-like growth factor 1*) insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IGT – (z ang. *impaired glucose tolerance*) upośledzona tolerancja glukozy

IL-1 – interleukina 1

IL-6 – interleukina 6

IL-10 – interleukina 10

IMT – (z ang. *intima-media thickness*) wskaźnik grubości kompleksu śródbłonek-błona środkowa

IR – (z ang. *insulin resistance*) insulinooporność

LDL-Ch – (z ang. *low density lipoprotein cholesterol*) cholesterol frakcji lipoprotein o niskiej gęstości

LH – (z ang. *luteinizing hormone*) hormon luteinizujący

MCP-1 – (z ang. *monocyte chemoattractant protein-1*) białko chemotaktyczne dla monocytów 1

MPV - (z ang. *mean platelet volume*) średnia objętość płytek krwi

NCEP-ATP III – (z ang. *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*) III Raport Zespołu Specjalistów Narodowego Programu Edukacji Cholesterolowej

NIH – (z ang. *National Institute of Health*) Narodowy Instytut Zdrowia

NT – nadciśnienie tętnicze

PAI-1 – (z ang. *plasminogen activator inhibitor-1*) inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1

PCOM – (z ang. *polycystic ovary morphology*) obraz ultrasonograficzny jajników torbielowatych

PCOS – (z ang. *polycystic ovary syndrome*) zespół wielotorbielowatych jajników

PRL – prolaktyna

PWV – (z ang. *pulse wave velocity*) prędkości propagacji fali tętna

cfPWV - prędkość propagacji fali tętna w odcinku szyjno-udowym

crPWV - prędkość propagacji fali tętna w odcinku szyjno-promieniowym

QUICKI – (z ang. *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) ilościowy wskaźnik wrażliwości na insulinę

RR – ciśnienie tętnicze

SBP – (z ang. *systolic blood pressure*) skurczowe ciśnienie tętnicze

SHBG – (z ang. *sex hormone binding globulin*) białko wiążące hormony płciowe

sE-selectin - (z ang. *soluble endothelial selectin*) rozpuszczalna forma E-selektyny

sICAM-1 – (z ang. *soluble intercellular adhesion molecule-1*) rozpuszczalna forma międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej-1

sVCAM-1 – (z ang. *soluble vascular cell adhesion molecule 1*) rozpuszczalna forma naczyniowej cząsteczki przylegania komórkowego typu 1

TCh – (z ang. *total cholesterol*) cholesterol całkowity

T2DM – (z ang. *type 2 diabetes mellitus*) cukrzyca typu 2

TG – (z ang. *triglycerides*) triglicerydy

TG/HDL-Ch - stosunek stężenia triglicerydów do cholesterolu frakcji HDL

TNF – (z ang. *tumor necrosis factor*) czynnik martwicy nowotworów

TSH – (z ang. *thyroid stimulating hormone*) hormone tyreotropowy

TST – (z ang. *testosterone*) testosteron

WHR – (z ang. *waist-hip ratio*) wskaźnik obwodu talii do obwodu bioder

VCAM-1 – (z ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) naczyniowa cząsteczka przylegania komórkowego typu 1

VLDL-Ch – (z *ang.* *very low density lipoprotein cholesterol*) cholesterol frakcji lipoprotein o bardzo niskiej gęstości

ZM – zespół metaboliczny

ŻCHZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa

SPIS TREŚCI

spis treści	7
1. WSTĘP	9
1.1 Definicja, epidemiologia i kryteria rozpoznania PCOS.....	9
1.2 Obraz kliniczny PCOS.....	11
1.3 Etiologia PCOS.....	13
1.3.1 Znaczenie insulinooporności w patogenezie PCOS	13
1.4 Zaburzenia metaboliczne w PCOS	15
1.4.1 Nadwaga i otyłość w PCOS.....	15
1.4.2 Zaburzenia gospodarki węglowodanowej w PCOS	16
1.4.3 Dyslipidemia w PCOS	17
1.4.4 Nadciśnienie tętnicze w PCOS	18
1.5 Nieklasyczne wskaźniki ryzyka rozwoju ChUSN u kobiet z PCOS.....	19
1.5.1 Pomiar prędkości propagacji fali tętna	19
1.5.2 Związek wybranych adipokin i wskaźników stanu zapalnego z ryzykiem sercowo-naczyniowym.....	20
1.6 Zastosowanie DŚA w leczeniu PCOS.....	24
2. CEL PRACY.....	26
3. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE.....	27
3.1 Materiał badawczy i przebieg badania.....	27
3.2 Metody badawcze	31
3.2.1 Pomiary antropometryczne	31
3.2.2 Pomiar PWV	31
3.2.3 Oznaczenia laboratoryjne	33
3.2.4 Uzyskiwanie surowic do oznaczeń cytokin	34
3.2.5 Oznaczanie stężenia cytokin w zebranych próbkach surowicy	34
3.2.6 Ocena insulinooporności/insulinowrażliwości	37
3.2.7 Analiza statystyczna uzyskanych wyników.....	37
4. WYNIKI.....	39
4.1 Charakterystyka badanych kobiet.....	39
4.2 Ocena i porównanie wpływu stosowania 6°miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane czynniki ryzyka rozwoju chorób układu sercowo- naczyniowego u kobiet z PCOS.....	41

4.2.1 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na BMI, obwód talii i skład ciała badanych kobiet	42
4.2.2 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na laboratoryjne wskaźniki androgenemii.....	43
4.2.3 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na wartości ciśnienia tętniczego oraz akcji serca	43
4.2.4 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na profil lipidowy oraz parametry gospodarki węglowodanowej.....	45
4.2.5 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane wskaźniki stanu zapalnego	47
4.2.6 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane wskaźniki dysfunkcji śródbłonna (PWV)	49
4.2.7 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane surowicze stężenia cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy i zaburzeń metabolicznych.....	50
5. DYSKUSJA	51
6. WNIOSKI	65
7. STRESZCZENIE.....	66
7.1 Streszczenie w języku polskim.....	66
7.2 Abstract in English (streszczenie w języku angielskim)	68
8. ANEKS	70
9. SPIS RYCIN I TABEL.....	71
10. LITERATURA.....	73

1. WSTĘP

Zespół wielotorbielowatych jajników (z ang. *polycystic ovary syndrome*, PCOS) będący najczęściej występującą endokrynopatią u kobiet w wieku rozrodczym, poza zaburzeniami miesiączkowania, płodności i objawami hiperandrogenemii, charakteryzuje się obecnością insulinooporności i wynikającej z niej hiperinsulinemii, które prowadzą do zaburzeń gospodarki węglowodanowej oraz lipidowej i w konsekwencji zwiększają ryzyko rozwoju miażdżycy a co za tym idzie chorób układu sercowo-naczyniowego (ChUSN) (Baldani i wsp., 2015; Katulski i Męczekalski, 2010). Doustne środki antykoncepcyjne (DŚA) są najczęstszą metodą farmakoterapii kobiet z PCOS. Badania ostatnich lat coraz częściej skupiają się nad bezpieczeństwem ich stosowania i potencjalnie niekorzystnymi efektami metabolicznymi, ale dotychczasowe wyniki są niejednoznaczne (Halperin i wsp., 2011). Z tych względów niniejsza praca dotyczy oceny wpływu stosowania DŚA na klasyczne czynniki ryzyka rozwoju ChUSN oraz wybrane wskaźniki stanu zapalnego, dysfunkcji śródbłonna oraz surowicze stężenia cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy i zaburzeń metabolicznych u kobiet z PCOS.

1.1 Definicja, epidemiologia i kryteria rozpoznania PCOS

PCOS po raz pierwszy został opisany w 1935 r. przez Steina i Leventhala, którzy zespół objawów klinicznych obejmujący hirsutyzm, trądzik, otyłość i wtórny brak miesiączki oraz wynikające z niego zaburzenia płodności powiązali ze znacznym powiększeniem jajników i pogrubieniem ich osłonki stwierdzonym w badaniu anatomopatologicznym (Azziz i Adashi, 2015). Częstość występowania PCOS występuje wśród 5 %, a w populacjach o dużym rozpowszechnieniu otyłości nawet 10 % kobiet w wieku rozrodczym (Azziz i wsp., 2004; Norman i wsp., 2007). Jednocześnie należy podkreślić, że jest to jedno z najbardziej heterogennych zaburzeń endokrynnych a różnice w częstości jego występowania i przebiegu klinicznym są zależne od czynników etnicznych i rasy badanych kobiet (Azziz i wsp., 2004). Z uwagi na wspomnianą różnorodność obrazu klinicznego i profilu hormonalnego rozpoznanie tego tak często występującego zespołu jest niestety trudne zwłaszcza wobec istotnych kontrowersji wokół jego definicji (Katulski i wsp., 2012). W 1990 r. Amerykański Narodowy Instytut Zdrowia (NIH, *National Institute of Health*) opracował kryteria diagnostyczne, w których jako zasadnicze

cechy PCOS przyjął nadmierne jajnikowe wydzielanie androgenów (hiperandrogenizm kliniczny lub biochemiczny) oraz brak owulacji (anowulacja) przy wykluczeniu innych schorzeń dających podobne objawy. W 2003 r. w Rotterdamie grupa ekspertów z Europejskiego Towarzystwa Rozrodczości Człowieka i Embriologii (*The Rotterdam ESHRE/ASRM – European Society for Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine, Consensus Workshop Group 2003*) ustanowiła tak zwane Kryteria Rotterdamskie. Według nich o rozpoznaniu PCOS decyduje obecność przynajmniej dwóch spośród trzech objawów:

- rzadkie owulacje lub brak owulacji – a co się z tym wiąże zaburzenia miesiączkowania o typie oligomenorrhea
- kliniczne i/lub biochemiczne objawy hiperandrogenemii
- obecność wielotorbielowatych jajników w obrazie ultrasonograficznym (PCOM, *polycystic ovary morphology*)

po wykluczeniu innych schorzeń przebiegających z hiperandrogenizmem i zaburzeniami miesiączkowania (Rotterdam, 2004).

Natomiast w 2006 r. Towarzystwo Nadmiaru Androgenów i PCOS (AE&PCOS, *Androgen Excess & PCOS Society*) wydało oświadczenie, że do potwierdzenia PCOS konieczna jest obecność klinicznych lub biochemicznych objawów hiperandrogenizmu z towarzyszącymi zaburzeniami miesiączkowania i/lub obecnością wielotorbielowatych jajników w obrazie USG przezpochwowym (PCOM). Zgodnie z tymi zaleceniami nie powinno rozpoznawać się PCOS jeśli nie stwierdza się cech hiperandrogenizmu (Azziz i wsp., 2006). Ponadto w każdym przypadku w trakcie diagnostyki należy wykluczyć inne potencjalne jego przyczyny. W praktyce klinicznej PCOS wymaga więc różnicowania z wrodzonym przerostem kory nadnerczy, zespołem/chorobą Cushinga oraz nowotworami produkującymi androgeny. Ponadto należy wykluczyć obecność hiperprolaktynemii oraz niedoczynności tarczycy, które także mogą prowadzić do zaburzeń miesiączkowania (Rachoń, 2012). W konsekwencji można wyodrębnić 4 rodzaje fenotypów PCOS. Najbardziej rozpowszechnioną postacią jest fenotyp PHO (44-65 %), czyli obecność zarówno wielotorbielowatych jajników (P), hiperandrogenizmu (H) i zaburzeń miesiączkowania o typie oligo/anowulacji (O) lub fenotyp HO (8-33 %), czyli obecność hiperandrogenizmu i oligo/anowulacji. Rzadziej występuje fenotyp HP (hiperandrogenizm, PCOM) (3-29 %) i fenotyp OP (oligoanowulacja, PCOM)

(0-23 %) (Moran i wsp., 2012a). Panel Ekspertów z Grupy Roboczej Narodowego Instytutu Zdrowia Stanów Zjednoczonych (*Expert Panel from a NIH Evidence Based Methodology Workshop on PCOS*) poleca celem diagnostyki stosowanie kryteriów Rotterdamskich, ponieważ pozwalają one wyodrębnić szerszą grupę pacjentek (Dunaif i Fauser, 2013).

1.2 Obraz kliniczny PCOS

Obraz kliniczny PCOS może być bardzo różnorodny. W większości przypadków objawy pojawiają się w okresie okołopokwitaniowym i często poprzedzone są przedwczesnym *adrenarche*. Po osiągnięciu dojrzałości płciowej zaburzenia miesiączkowania o charakterze oligomenorrhea lub wtórnego braku miesiączki występują u 90 % pacjentek, a sam zespół jest jedną z najczęstszych przyczyn braku owulacji, czego następstwem są zaburzenia płodności. Długość cyklu miesięczkowego mieszcząca się w granicach normy (co 21-35 dni) stwierdzana u około 20 % kobiet z PCOS nie wyklucza braku owulacji. W diagnostyce ultrasonograficznej za typowy obraz wielotorbielowatych jajników uważa się zwiększenie objętości co najmniej jednej gonady powyżej 10 ml na skutek zwiększenia ilości jej zrębu i/lub obecność co najmniej 12 pęcherzyków o średnicy 2-9 mm blisko zewnętrznej powierzchni jajników w kształcie „sznura pereł” (Balen i wsp., 2003). Z uwagi jednak na to, iż obraz ten nie jest patognomoniczny dla PCOS i może występować nawet u 50 % prawidłowo miesiączkujących kobiet, Europejskie Towarzystwo Endokrynologiczne obecnie zaleca rozpoznanie PCOM w oparciu o wielkość gonad tj. objętość powyżej 10 ml oraz iloraz objętości zrębu jajnika do jego całkowitej objętości powyżej 0.32 (Conway i wsp., 2014). Wiadomo także, że tylko 75 % pacjentek z PCOS spełnia ultrasonograficzne kryteria rozpoznania PCOM (Jonard i wsp., 2003). Najczęstszym klinicznym objawem hiperandrogenizmu jest hirsutyzm definiowany jako występowanie u kobiet owłosienia typu męskiego, czyli włosów grubych i pigmentowanych, w takich miejscach jak twarz, klatka piersiowa, kresa biała, nad- i podbrzusze, wewnętrzna powierzchnia ud, plecy. Czynniki etniczne lub rasowe mogą także mieć wpływ na typ owłosienia ciała i jego dystrybucję. Ponadto hiperandrogenizm często objawia się przetłuszczaniem się skóry a co za tym idzie powstawaniem zmian trądzikowych oraz wypadaniem włosów (łysieniem androgenowym). Powyższe

objawy mają zwykle początek w okresie pokwitania lub krótko po nim. Zdarza się jednak, że dopiero znaczny przyrost masy ciała ujawnia cechy fenotypowe PCOS. W badaniu należy także ustalić, czy występują cechy wirylizacji (obniżenie barwy głosu, przyrost masy mięśniowej, zanik piersi, przerost łechtaczki) i jaka jest ich dynamika. Późny początek objawów hiperandrogenizacji i ich nagłe narastanie wymaga wykluczenia obecności guza wirylizującego. Objawy wirylizacji nie są typowe dla PCOS. Poza guzami jajnika lub nadnerczy produkującymi androgeny, mogą one także występować w przerście komórek zrębu jajnika (komórek tekalnych) (*hyperthecosis*) (Rachoń, 2012).

Zaburzenia hormonalne obserwowane w PCOS dotyczą także wydzielania gonadotropin. Jedną z najczęściej opisywanych cech jest czynnościowa zmiana wydzielania hormonu luteinizującego (LH, *luteinizing hormone*) przez przedni płat przysadki na skutek zwiększonej aktywności „generatora pulsów” GnRH w podwzgórzu. Skutkuje to podwyższonym stosunkiem stężenia LH do folikulotropiny (FSH, *follicle-stimulating hormone*) – $LH/FSH > 2$. Według większości ekspertów podstawową nieprawidłowością w PCOS jest jednak nadmierna jajnikowa produkcja androgenów. Jajniki kobiet z PCOS poza testosteronem produkują także w dużych ilościach jego prekursor – androstendion, który razem z siarczanem dehydroepiandrosteronu (DHEA-S) jest wytwarzany również w korze nadnerczy. Hiperandrogenemia w PCOS nie jest więc jedynie pochodzenia jajnikowego a za wspólną przyczynę nadmiernej produkcji androgenów w jajnikach i nadnerczach uważa się zwiększoną aktywność enzymatyczną kluczowego dla syntezy androgenów enzymu cytochromu P450c17 α . Hiperandrogenemia u kobiet z PCOS prowadzi z kolei do hiperestrogenizmu wynikającego ze zwiększonej aromatyzacji androgenów w tkankach obwodowych (wątroba, mięśnie i tkanka tłuszczowa), co prowadzi do przerostu endometrium a klinicznie objawia się obfitymi krwawieniami z dróg rodnych (Park i wsp., 2011). Z tego samego powodu u około 20 % pacjentek z PCOS stwierdza się obecność umiarkowanej hiperprolaktynemii. Objawy kliniczne PCOS zależą nie tylko od profilu hormonalnego, ale również od współistnienia otyłości i wrażliwości tkanek docelowych na hormony steroidowe, co tłumaczy to różnorodność fenotypową PCOS.

1.3 Etiologia PCOS

Pomimo wielu badań dokładne mechanizmy patogenetyczne PCOS nie zostały dotychczas do końca wyjaśnione. W powstaniu tego zespołu nie bez znaczenia są zarówno czynniki genetyczne, hormonalne, jak i środowiskowe (Franks i Berga, 2012; Welt i Carmina, 2013). Powszechnie uważa się, że czynnikiem pierwotnym są zaburzenia steroidogenezy jajnikowej prowadzące do nadmiernego wytwarzania androgenów. Mniejszą rolę odgrywają zaburzenia osi podwzgórze-przysadka-jajnik. Kliniczne lub biochemiczne cechy zespołu mogą rozwijać się jako konsekwencja prenatalnej ekspozycji na działanie androgenów (Xita i Tsatsoulis, 2006), bądź niskiej masy urodzeniowej (Ucar i wsp., 2014).

1.3.1 Znaczenie insulinooporności w patogenezie PCOS

Już na początku lat 80 XX wieku zaobserwowano, że insulinooporność (*IR* – *insulin resistance*) i kompensująca ją hiperinsulinemia mogą odgrywać szczególną rolę w etiopatogenezie PCOS (Dunaif, 1997). Stwierdzono również istnienie związku pomiędzy występowaniem zmian skórnych o typie rogowacenia ciemnego (*acantosis nigricans*) a ciężką opornością na insulinę oraz występowaniem hiperandrogenizmu i braku owulacji u części pacjentek z PCOS. Obserwacja ta sugerowała możliwość istnienia wspólnej etiologii pomiędzy hiperandrogenizmem, insulinoopornością i hiperinsulinemią. Warunkiem aktywności biologicznej insuliny jest jej połączenie się ze swoistym receptorem oraz prawidłowa czynność kompleksu receptorowego. Wyniki badań wskazują jednak, że u kobiet z PCOS liczba receptorów insulinowych i ich powinowactwo do insuliny są prawidłowe. Dlatego bardziej prawdopodobnym mechanizmem powstawania insulinooporności w tej grupie kobiet są wewnątrzkomórkowe zaburzenia dróg sygnalizacyjnych działania insuliny. Wzmoczona autofosforylacja reszt serynowych podjednostki β receptora insulinowego obniża aktywność kinazy białkowo-tyrozynowej, co może być jednym z mechanizmów prowadzących do IR postreceptorowej u kobiet z PCOS (Dunaif i wsp., 1995). Sugeruje się także istnienie defektu genu kodującego białko odpowiedzialne za fosforylację seryny w obrębie receptora insulinowego, jak i enzymu odpowiedzialnego za syntezę androgenów nadnerczowych i jajnikowych – P450c17 (Franks i McCarthy, 2004). Fosforylacja cytochromu P450c17 może nasilać aktywność enzymów biorących udział w jajnikowej syntezie androgenów

(17-hydroksylazy i 17,20-liazy) (Zhang i wsp., 1995). Wskazywałoby to na wspólne uwarunkowania zaburzeń syntezy steroidów prowadzących do hiperandrogenizmu oraz defektu działania insuliny prowadzącego do IR. Na uwarunkowania genetyczne PCOS wskazują także zaburzenia sekrecji i działania insuliny stwierdzone u krewnych I stopnia pacjentek z tym zespołem. Wymienia się także geny regulujące sekrecję insuliny, takie jak gen kodujący receptor insulinowy, gen VNRT (rozproszone fragmenty genu insuliny), gen substratu receptora insulinowego, gen IGF-1 (z ang. *insulin - like growth factor 1* - insulinopodobny czynnik wzrostu 1), gen receptora dla IGF-1 oraz gen białka wiążącego IGF-1. Oprócz opisanych powyżej mechanizmów molekularnych wpływ insuliny na produkcję androgenów może być także efektem jej bezpośredniego działania na gonadę żeńską. Insulina stymuluje steroidogenezę jajnikową poprzez interakcje z receptorem insulinowym i receptorem dla IGF-1 zlokalizowanym w komórkach tekalnych, komórkach warstwy ziarnistej oraz podścieliska jajnika. Jednocześnie hiperinsulinemia zwiększa wrażliwość komórek ziarnistych i komórek tekalnych jajnika na działanie LH (prawdopodobnie przez wzrost stężenia receptorów dla LH). Wspomniana już zwiększona aktywność generatora pulsów GnRH prowadzi do podwyższonego wydzielania LH przez przedni płat przysadki co w konsekwencji powoduje zaburzenia miesiączkowania związane z przedwczesnym dojrzewaniem pęcherzyków jajnikowych i brakiem możliwości osiągnięcia stadium pęcherzyka dominującego (Moore i Campbell, 2015). Jednocześnie insulina pośrednio nasila jajnikową produkcję androgenów poprzez synergistyczne z LH działanie stymulujące komórki tekalne do syntezy androstendionu. Dodatkowo wysokie stężenia insuliny hamują wątrobową syntezę białka wiążącego hormony płciowe (z ang. *sex hormone binding globulin*, SHBG), co w konsekwencji zwiększa stężenie wolnego, biologicznie aktywnego testosteronu w surowicy krwi.

Ocenia się, że insulinooporność dotyczy 44 – 70 % pacjentek z PCOS (Diamanti-Kandarakis i Dunaif, 2012). Jednocześnie obecność IR może być niezależna od wskaźnika masy ciała (z ang. *body mass index*, BMI), chociaż znacznie częściej stwierdza się ją u kobiet otyłych z tym zespołem (Marshall i Dunaif, 2012). Wykazano również, że otyłe pacjentki z PCOS charakteryzują się większym stopniem insulinooporności niż kobiety z PCOS i prawidłową wagą ciała (Stepito i wsp., 2013). U tych kobiet wśród potencjalnych przyczyn IR, poza wspomnianymi już defektami genu receptora dla insuliny i nadmierną fosforylacją seryny w tym

receptorze, sugeruje się również defekt transportera glukozy GLUT 4 oraz zwiększoną lipolizę prowadzącą do wzrostu stężenia wolnych kwasów tłuszczowych (z ang. *free fatty acids*, FFA) i lipotoksyczności (Boden, 2011; Chen i wsp., 2014). Niestety w praktyce lekarskiej IR jest trudna do obiektywnej oceny, ale fakt, że leży ona u podstaw wielu niekorzystnych następstw, rodzi pytanie w jaki sposób u kobiet z rozpoznaniem PCOS oceniać stopień IR. Istnieje kilka metod pomiaru wrażliwości tkanek na działanie insuliny. „Złotym standardem” jest tak zwany test „klamry euglikemicznej” polegający na stałym, uzależnionym od powierzchni ciała wlewie insuliny i równoczesnym wlewie glukozy w takiej ilości, aby utrzymać normoglikemię. Miara insulinooporności jest zużycie glukozy – im większa insulinooporność, tym jest ono mniejsze. Ze względu na trudności tej metody nie jest ona praktykowana w warunkach klinicznych i stosuje się ją jedynie w wyspecjalizowanych ośrodkach, głównie w celach naukowych. Dlatego też opracowano wiele zastępczych wskaźników insulinooporności i insulinowrażliwości, opierających się jedynie na pomiarze stężeń glukozy i insuliny na czczo oraz na teście tolerancji 75 g glukozy (DTTG 75 g). Niemniej jednak wykazanie obecności insulinooporności u pacjentek z PCOS nie stanowi kryterium rozpoznania tego zespołu (Conway i wsp, 2014).

1.4 Zaburzenia metaboliczne w PCOS

Kobiety z PCOS są narażone na ryzyko rozwoju zaburzeń metabolicznych podobnych do tych, które występują w zespole metabolicznym. W wielu doniesieniach naukowych podkreśla się, że u kobiet z PCOS istnieje zwiększone ryzyko rozwoju T2DM, nadciśnienia tętniczego (NT), dyslipidemii i miażdżycy. Niektórzy uważają nawet PCOS za wariant zespołu metabolicznego. Stworzone przez zespół Dunaif i wsp. określenie „zespół XX” podkreśla wagę możliwych konsekwencji sercowo-naczyniowych PCOS (Sam i Dunaif, 2003).

1.4.1 Nadwaga i otyłość w PCOS

Otyłość jest dominującym kryterium rozpoznania zespołu metabolicznego (ZM). Stwierdza się, że nadwaga lub otyłość towarzyszy pacjentkom z PCOS w około 38 – 50 % przypadków, a w Stanach Zjednoczonych wzrasta nawet do 70 – 80 %

(Carmina i wsp., 2003). Dla PCOS charakterystyczna jest otyłość typu centralnego (obwód pasa u kobiet ≥ 80 cm). Jednocześnie prawidłowa wartość BMI nie wyklucza zwiększonej akumulacji tkanki tłuszczowej w okolicy jamy brzusznej (Yildirim i wsp., 2003). Nadmiar tkanki tłuszczowej przyczynia się do nieprawidłowego metabolizmu hormonów płciowych, zwiększonej produkcji androgenów i zmniejszenia wątrobowej produkcji SHBG (Pasquali, 2006), jednocześnie pogarszając kliniczny przebieg PCOS (Lim i wsp., 2013). Z drugiej strony hiperandrogenemia sprzyja rozwojowi otyłości centralnej i insulinooporności. Tkanka tłuszczowa jest aktywnym narządem wydzielniczym produkującym liczne substancje o działaniu auto- i parakrynnym. Poprzez ich oddziaływanie na procesy metaboliczne toczące się w innych tkankach (mięśnie szkieletowe, podwzgórze, komórki β trzustki) postrzegana jest również jako gruczoł wydzielania wewnętrznego (endokryny) (Kershaw i Flier, 2004). Produkty adipocytów i komórek immunokompetentnych tkanki tłuszczowej nazywane adipokinami oprócz udziału w procesie dojrzewania i różnicowania adipocytów, metabolizmie węglowodanów i lipidów, wywierają wpływ na śródbłonek naczyń, procesy zapalne, immunologiczne a także układ krzepnięcia i fibrynolizy. Z tych powodów postrzegane są jako ogniwo łączące otyłość z rozwojem miażdżycy (Ntaios i wsp., 2013; Yoo i Choi, 2014). Nadmiar tkanki tłuszczowej trzewnej, najbardziej aktywnej pod względem wydzielniczym, wiąże się z dysregulacją produkcji adipokin. Dochodzi do zwiększenia wytwarzania FFA, leptyny, rezystyny, wisfatyny i zmniejszenia produkcji adiponektyny (Villa i Pratley, 2011). Obecność otyłości wiąże się z ryzykiem rozwoju T2DM i ChUSN, nowotworów hormonozależnych, częstszym występowaniem zaburzeń miesiączkowania, niepłodności, cukrzycy ciężarnych, poronień (Pasquali i wsp., 2006).

1.4.2 Zaburzenia gospodarki węglowodanowej w PCOS

Związek między zaburzeniami metabolizmu węglowodanów i hiperandrogenizmem po raz pierwszy opisali Achard i Thiers w 1921 r. jako „cukrzycę brodatych kobiet” (*diabète des femmes à barbe*). Od tego czasu wielokrotnie stwierdzano, że zaburzenia gospodarki węglowodanowej dotyczą kobiet z PCOS częściej niż populacji kobiet zdrowych, a rozpoznanie PCOS uznawane jest za czynnik ryzyka wystąpienia upośledzonej tolerancji glukozy (z ang. *impaired glucose tolerance*, IGT) i T2DM zarówno przez Polskie jak i Amerykańskie Towarzystwo

Diabetologiczne. Wyniki badań wykazały, że IGT dotyczy około 23 – 35 %, a T2DM 4 – 10 % kobiet z PCOS w Stanach Zjednoczonych (Diamanti-Kandarakis i Dunaif, 2012). Stanowi to 3 – 7-krotne zwiększenie całkowitego ryzyka rozwoju powyższych zaburzeń oraz 2-krotnie większe ryzyko w porównaniu z odpowiednio dobraną pod względem wieku i masy ciała grupą kobiet prawidłowo miesiączkujących (Legro i wsp., 1999; Randeva i wsp., 2012). Zaobserwowano, iż rozpowszechnienie zaburzeń gospodarki węglowodanowej różni się zależnie od wieku, pochodzenia etnicznego oraz kraju zamieszkania, co sugeruje, że czynniki środowiskowe mogą odgrywać dominującą rolę w określeniu indywidualnej podatności na wystąpienie zaburzeń metabolicznych i prawdopodobnie są ważniejsze od czynników genetycznych. Podobnie jak w populacji ogólnej kluczowe znaczenie patogenetyczne w rozwoju zaburzeń tolerancji glukozy przypisuje się insulinooporności a otyłość, zwłaszcza typu centralnego, stanowi najważniejszy czynnik ryzyka. Według Moran i wsp. (2010) ryzyko IGT jest u kobiet z PCOS 2.5-krotnie większe a ryzyko T2DM 4-krotnie większe w porównaniu z grupą kobiet zdrowych z podobnym BMI. Chociaż otyłość i wiek znacząco zwiększają ryzyko wystąpienia IGT i T2DM, zaburzenia te często występują także u szczupłych kobiet z PCOS (odpowiednio u 10 % i 1.5 %) (Legro i wsp., 1999). Ponadto wielokrotnie częściej u ciężarnych kobiet z PCOS rozpoznaje się cukrzycę ciążową (z ang. *gestational diabetes mellitus*, GDM) (Boomsma i wsp., 2006). Natomiast stwierdzenie ciąży u kobiety z PCOS stanowi wskazanie do jak najszybszego wykonania DTTG 75 g. U kobiet z PCOS i dodatnim wywiadem w kierunku GDM ryzyko wystąpienia lub utrwalenia zaburzeń gospodarki węglowodanowej jest również większe (Palomba i wsp., 2012). Z tych względów Polskie Towarzystwo Diabetologiczne zaleca prowadzenie badań przesiewowych w kierunku zaburzeń gospodarki węglowodanowej u kobiet z rozpoznaniem PCOS co roku niezależnie od wieku pacjentki (Polskie Towarzystwo Diabetologiczne, 2014).

1.4.3 Dyslipidemia w PCOS

Dyslipidemia jest najbardziej powszechnym zaburzeniem metabolicznym w PCOS (Randeva i wsp., 2012). Występujące nieprawidłowości gospodarki lipidowej są podobne do tych spotykanych w ZM i T2DM i charakteryzują się obniżonym stężeniem cholesterolu frakcji HDL, podwyższonym stężeniem TG i obecnością

małych, gęstych cząsteczek LDL cholesterolu (Wild i wsp., 2011). Współwystępowanie tych trzech nieprawidłowości określamy mianem dyslipidemii aterogennej. Chociaż podwyższone stężenie LDL i VLDL cholesterolu u kobiet z PCOS mogą być niezależne od obecności otyłości, to podwyższone stężenie TG i obniżone stężenie HDL cholesterolu są ściśle związane ze współistnieniem otyłości i insulinooporności. Jednakże nieprawidłowości w metabolizmie lipidów mogą być spowodowane również nadmiarem androgenów. Ponadto u kobiet z PCOS stwierdza się istotnie mniejsze stężenie HDL 2 – podklasy HDL o najsilniejszych właściwościach antyaterogennych wśród wszystkich podklas HDL cholesterolu a jednocześnie istotne zwiększenie stężenia lipoproteiny (a) oraz małych, gęstych cząsteczek LDL cholesterolu o silnych właściwościach aterogennych (Berneis i wsp., 2009). Powyższe nieprawidłowości mogą być jednym z czynników zwiększających ryzyko rozwoju ChUSN u kobiet z PCOS.

1.4.4 Nadciśnienie tętnicze w PCOS

Czynniki potencjalnie odpowiedzialne za rozwój NT w PCOS to podwyższone stężenie androgenów w surowicy, otyłość i powiązana z nią insulinooporność. Kompensacyjna hiperinsulinemia wpływa na dysfunkcję śródbłonna poprzez stymulację rozrostu mięśniówki gładkiej naczyń i podwyższony poziom endoteliny-1 w surowicy, jednocześnie przyczyniając się do zwiększenia surowiczych stężeń aldosteronu i aktywacji układu współczulnego (Bentley-Lewis i wsp., 2011). Dotychczasowe badania epidemiologiczne sugerują częstsze występowanie NT u kobiet z PCOS, zwłaszcza tendencję do podwyższonych wartości skurczowego ciśnienia tętniczego (z ang. *systolic blood pressure*, *SBP*), większą zmienność ciśnienia tętniczego (z ang. *blood pressure*, *BP*) w ciągu dnia oraz brak fizjologicznej redukcji wartości BP w ciągu nocy. Czynnikiem ograniczającym interpretację tych badań jest zwiększona częstość występowania otyłości wśród kobiet z PCOS, która niezależnie stanowi znaczący czynnik ryzyka rozwoju NT. Lo i wsp. (2006) wykazali, iż ryzyko podwyższonych wartości BP jest 40 % większe w populacji kobiet z PCOS w porównaniu z populacją kobiet zdrowych niezależnie od wieku, BMI, występowania T2DM lub dyslipidemii. Jednakże to właśnie wartość BMI wydaje się być znaczącym czynnikiem prognostycznym rozwoju NT u kobiet z PCOS (Luque-Ramirez i wsp., 2007b). Istnieją również doniesienia nie

potwierdzające częstszego występowania NT w populacji kobiet z PCOS po uwzględnieniu wskaźnika BMI (Meyer i wsp., 2005). Podobne wnioski oraz brak znamienne zwiększonego wskaźnika chorobowości i śmiertelności z powodu choroby niedokrwiennej serca (ChNS) wysunęli Wild i wsp. (2000). Ponieważ NT jest niepodważalnym czynnikiem ryzyka rozwoju ChUSN, jego potencjalnie większa częstość występowania u kobiet z PCOS może to ryzyko zwiększać. Z tego powodu towarzystwa endokrynologiczne zalecają regularną kontrolę wartości BP oraz innych czynników mogących przyczyniać się do jego rozwoju a także leczenie ewentualnych nieprawidłowości u kobiet z PCOS celem prewencji ChUSN.

1.5 Nieklasyczne wskaźniki ryzyka rozwoju ChUSN u kobiet z PCOS

1.5.1 Pomiar prędkości propagacji fali tętna

Pomiar prędkości propagacji fali tętna (z ang. *pulse wave velocity*, PWV) jest prostą i nieinwazyjną metodą oceny sztywności ścian naczyń tętniczych. W ciągu życia najbardziej dynamiczne zmiany strukturalno-czynnościowe zachodzą w ścianach tętnic centralnych, dlatego największe znaczenie kliniczne ma pomiar wartości PWV pomiędzy tętnicą szyjną wspólną i tętnicą udową. Wynik pomiaru szyjno-udowej lub aortalnej PWV to obecnie parametr uznany za złoty standard w ocenie sztywności ścian tętnic (Laurent i wsp., 2006). Wraz z wiekiem dochodzi do upośledzenia własności elastycznych tętnic i narastania ich sztywności, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu PWV. Proces ten koreluje również z procesami zapalenia i wapnienia w obrębie ściany tętnic natomiast inne klasyczne czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego jak palenie papierosów, poziom glikemii i lipidów w mniejszym stopniu wpływają na jego nasilenie (Cecelja i Chowienczyk, 2009). Wynik pomiaru aortalnej PWV ma znaczenie rokownicze zarówno w populacji ogólnej (Willeum-Hansen i wsp., 2006), jak i u chorych podwyższonego ryzyka sercowo-naczyniowego (Vlachopoulos i wsp., 2010), z nadciśnieniem tętniczym (Laurent i wsp., 2001), T2DM (Cruickshank i wsp., 2002), przewlekłą niewydolnością nerek (Safar i wsp., 2002), wiąże się także z ryzykiem wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych (Mattace-Raso i wsp., 2006).

Zgodnie z opublikowanymi w 2013 r. wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego i Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego pomiar

PWV należy do zalecanych badań dodatkowych u chorych z NT a jego wartość powyżej 12 m/s uznano jako jeden z wykładników podklinicznego uszkodzenia narządów w tej grupie chorych (Mancia i wsp., 2013). Wobec tego pomiar PWV u pacjentek z PCOS najprawdopodobniej także może dostarczyć cennych informacji dotyczących ryzyka rozwoju ChUSN w tej grupie kobiet.

1.5.2 Związek wybranych adipokin i wskaźników stanu zapalnego z ryzykiem sercowo-naczyniowym

Jak wspomniano powyżej adipokiny produkowane przez komórki tkanki tłuszczowej i komórki immunokompetentne są zaangażowane w metabolizm węglowodanów, lipidów, procesy zapalne, immunologiczne, krzepnięcia i fibrynolizy oraz wywierają wpływ na śródbłonek naczyń. Jednakże w przypadku nadmiaru tkanki tłuszczowej trzewnej dochodzi do dysregulacji produkcji adipokin i przewagi czynników prozapalnych (TNF, IL-1, IL-6, PAI-1, leptyna, rezystyna, MCP-1) nad czynnikami przeciwzapalnymi (adiponektyna, IL-10) (Kershaw i Flier, 2004; Lee i Pratley, 2005). Powyższe procesy są również charakterystyczne dla kobiet z PCOS co może być jednym z czynników ryzyka rozwoju ChUSN (Gonzalez, 2012). Dotychczas nie jest jasne, czy dysregulacja produkcji cytokin wynika z tendencji do gromadzenia się tkanki tłuszczowej w obrębie jamy brzusznej, czy jest cechą samego PCOS (Puder i wsp., 2005; Verit, 2010).

1.5.2.1 Białko C-reaktywne (z ang. C-reactive protein, CPR)

CRP stanowi jeden ze wskaźników procesu zapalnego. Coraz częściej podkreśla się związek podwyższonego stężenia CRP w surowicy z ryzykiem wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych oraz obecnością tak zwanych klasycznych czynników ryzyka rozwoju ChUSN ocenianych w skali ryzyka *Framingham*. W wielu badaniach wykazano, że CRP aktywuje układ dopełniacza, przyczynia się do dysfunkcji śródbłonna, indukuje gotowość prozakrzepową i wpływa na wydzielanie czynników destabilizujących blaszkę miażdżycową, m.in. białko chemotaktyczne dla monocytów 1 (MCP-1) (Bisoendial i wsp., 2010). W związku z powyższym CRP jest coraz częściej postrzegany jako czynnik proaterogeny (Hansson, 2005), a jego podwyższone stężenie w surowicy [oznaczone testem

wysokiej czułości tzw. *high-sensitivity*-CRP (hs-CRP) powyżej 3 mg/dl] stanowi niezależną wartość predykcyjną wystąpienia zdarzenia sercowo-naczyniowego u osób klinicznie zdrowych jak i u pacjentów z rozpoznaną chorobą wieńcową lub po przebytych incydencie sercowo-naczyniowym (Kaptoge i wsp., 2010). Podwyższone stężenia CRP zaobserwowano również w surowicy kobiet z PCOS (Samy i wsp., 2009). Escobar-Morreale i wsp. (2011) w metaanalizie badań dotyczących markerów stanu zapalnego wśród kobiet z PCOS opisali 2-krotny wzrost surowiczego stężenia CRP w porównaniu z grupą kobiet zdrowych. Zauważyli również, iż proces ten jest bardziej nasilony u kobiet z PCOS i towarzyszącą otyłością, zapewne z powodu nadmiernej produkcji cytokin prozapalnych w tym IL-6 przez jednojądrzaste komórki naciekające tkankę tłuszczową. IL-6 jest najsilniejszym stymulatorem syntezy CRP i fibrynogenu w wątrobie. Oczywisty więc jest związek podwyższonego stężenia CRP z akumulacją tkanki tłuszczowej trzewnej, wzrostem insulinooporności i uszkodzeniem funkcji śródbłonna (Tarkun i wsp., 2004).

1.5.2.2 *Fibrynogen*

Ze zwiększonym ryzykiem rozwoju ChUSN u kobiet z PCOS wiąże się nie tylko istniejący stan prozapalny, ale również prozakrzepowy (Burchall i wsp., 2011). Zaburzenia funkcji układu krzepnięcia i fibrynolizy w PCOS mają złożony patomechanizm i są integralnie związane ze współistniejącą dysfunkcją śródbłonna i ścian naczyń. Dotychczasowe badania dowiodły upośledzonej funkcji płytek krwi, zwłaszcza zwiększonej średniej objętości płytki (z ang. *mean platelet volume*, MPV) (Kebapcilar i wsp., 2009), która uznawana jest jako niezależny czynnik ryzyka sercowo-naczyniowego. Ponadto stwierdzono podwyższone poziomy ADMA (z ang. *asymmetric dimethyl-arginine*), PAI-1 (z ang. *plasminogen activator inhibitor-1*) oraz fibrynogenu w surowicy, świadczące o dysfunkcji śródbłonna naczyń (Moran i wsp., 2012b).

Podwyższony surowiczy poziom fibrynogenu poprzez wpływ na agregację płytek krwi może powodować nadmierną lepkość krwi i związane z tym zwiększenie ryzyka wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych. Sugeruje się, aby parametr ten uchodził za czynnik ryzyka miażdżycy, CHNS i zawału mięśnia sercowego (Nasiek i wsp., 2007). Jednocześnie związek przewlekłego stanu zapalnego o niewielkim

nasileniu z zaburzeniami procesów krzepnięcia i fibrynolizy może sugerować, iż kobiety z wyższym stężeniem CRP w surowicy mają także większe ryzyko podwyższonego stężenia fibrynogenu (Manneras-Holm i wsp., 2011).

1.5.2.3 Chemeryna

Chemeryna jest nowo poznaną adipokina wytwarzaną głównie w tkance tłuszczowej i wątrobie w postaci prochemeryny, która pod wpływem proteaz serynowych staje się aktywna i działa jako wydzielniczy ligand dla receptorów chemokinowych: receptora GPR 1 (z ang. *G protein-coupled receptor 1*), receptora CCRL2 (z ang. *chemokine C-C motif receptor like 2*), receptora CMKLR-1 (z ang. *chemokine-like receptor 1*). Chemeryna odgrywa ważną rolę w procesie różnicowania adipocytów (Goralski i wsp., 2007). Podwyższone surowicze stężenia chemeryny stwierdzono u pacjentów z łuszczycą, przewlekłym zapaleniem wątroby typu C, niealkoholowym stłuszczeniowym zapaleniem wątroby, reumatoidalnym zapaleniem stawów i innymi przewlekłymi chorobami zapalnymi. Obecnie uważa się, że chemeryna jest czynnikiem modulującym reakcję zapalną i odpowiedź immunologiczną (Rourke i wsp., 2013). Nasila procesy zapalne jako czynnik chemotaktyczny dla komórek immunokompetentnych – przede wszystkim makrofagów, komórek dendrytycznych i komórek NK do obszarów zapalenia (Zabel i wsp., 2005). Jednocześnie hamuje wytwarzanie cytokin prozapalnych (IL-6, TNF) i pobudza syntezę adiponektyny. Bozaoglu i wsp. (2007) badając populację osób z prawidłową tolerancją glukozy i T2DM stwierdzili znamienne wyższe stężenia chemeryny w grupie osób otyłych oraz wyraźnie dodatnią korelację pomiędzy jej stężeniem a takimi parametrami jak: glikemia i insulinemia na czczo, poziom triglicerydów w surowicy oraz ciśnienie tętnicze krwi. Powyższe wyniki sugerują, iż chemeryna może być mediatorem łączącym otyłość z czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego i być może potencjalnym markerem rozpoznania ZM. Jednocześnie sugerowany jest również związek tej adipokiny z rozwojem miażdżycy, wpływ na insulinowrażliwość i wychwyt glukozy w adipocytach i komórkach mięśni szkieletowych oraz rekrutację komórek immunokompetentnych do miejsc zmienionych miażdżycowo. Surowicze stężenie chemeryny silnie koreluje z surowiczym poziomem innych wskaźników stanu zapalnego: CRP, IL-6 i TNF (Lehrke i wsp., 2009), będących jednocześnie markerami ryzyka sercowo-naczyniowego i jednymi z czynników odpowiedzialnych

za proces arteriosklerozy. Przeprowadzone przez naukowców chińskich badania sugerują, że podwyższone stężenia chemeryny u pacjentów z ZM można uznać za czynnik ryzyka rozwoju choroby wieńcowej w tej grupie (Dong i wsp., 2011). Zmiany stężeń adipokin we krwi, zwłaszcza chemeryny, są wykrywane w stanie przedcukrzycowym i znamienne wyższe u pacjentów z IGT w porównaniu z pacjentami z nieprawidłową glikemią na czczo (z ang. *impaired fasting glucose*, IFG) (Tonjes i wsp., 2010).

1.5.2.4 Białko chemotaktyczne dla monocytów 1 (MCP-1)

Białko chemotaktyczne dla monocytów 1 (MCP-1/CCL2) jest jedną z kluczowych chemokin regulujących migrację monocytów do ognisk zapalenia, ale także uczestniczy w procesie aterogenezy (Deshmane i wsp., 2009). Receptor dla MCP-1 zlokalizowany jest nie tylko na krążących monocytach, ale także na komórkach mięśniówki naczyń, co sugeruje udział MCP-1 w ich proliferacji. U osób otyłych dochodzi do infiltracji tkanki tłuszczowej przez makrofagi będące źródłem TNF i IL-6, których nadmierna ekspresja przyczynia się do nadmiernej syntezy MCP-1 i naciekania przez monocyty nie tylko tkanki tłuszczowej, ale także ściany naczyń co w konsekwencji prowadzi to do powstania przewlekłego stanu zapalnego, insulinooporności i rozwoju miażdżycy (Weisberg i wsp., 2003).

1.5.2.5 Częsteczka adhezyjna komórek śródbłónka 1 (z ang. *vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1)

VCAM-1, inaczej naczyniowa częsteczka przylegania komórkowego typu 1 umiejscowiona jest w komórkach endotelium, ale jej zewnętrzna część pod wpływem reakcji enzymatycznej może ulec oddzieleniu i krążyć we krwi w formie rozpuszczalnej (z ang. *soluble*, *sVCAM-1*). Od dawna podkreśla się znaczenie rozpuszczalnych form cząsteczek adhezyjnych sICAM-1 (z ang. *soluble intercellular adhesion molecule-1*), sE-selektyny (z ang. *soluble E-selectin*) a zwłaszcza sVCAM-1 w patogenezie miażdżycy. Pierwszym jej etapem jest adhezja monocytów do komórek śródbłónka wskutek zwiększonej ekspresji cząsteczek adhezyjnych. Następnie pod wpływem wspomnianego już białka chemotaktycznego dla monocytów 1 (MCP-1) ma miejsce migracja monocytów przez komórki

śródbłónka do ściany naczynia, uwolnienie prozapalnych cytokin, przekształcenie w makrofagi, a po sfagocytowaniu lipidów utworzenie komórki piankowej. Dowiedziono także, iż pacjenci z ZM oraz większym stopniem insulinooporności mierzonym przy pomocy wskaźnika HOMA cechują się nie tylko wyższym stężeniem CRP, fibrynogenu, PAI-1 w surowicy ale także naczyniowych markerów stanu zapalnego (sVCAM-1, sICAM-1) (Kressel i wsp., 2009).

1.5.2.6 Interleukina 10 (IL-10)

IL-10 to cytokina przeciwzapalna wytwarzana przez limfocyty Th 2, limfocyty B, makrofagi i monocyty, której główne zadanie polega na regulacji odpowiedzi immunologicznej. Hamuje wiele reakcji immunologicznych m.in. wytwarzanie cytokin przez limfocyty Th 1, prezentację antygenów oraz swoistą antygenowo proliferację komórek T. W ten sposób ogranicza syntezę cytokin prozapalnych TNF, IL-1, IL-6. Interleukina-10 może odgrywać rolę w stabilizacji blaszki miażdżycowej i hamować proces zapalny w ścianie naczynia, jak również zapobiegać rozwojowi insulinooporności u osób zdrowych. U chorych z niestabilną chorobą wieńcową poziom IL-10 jest obniżony w porównaniu z osobami z przewlekłą stabilną chorobą wieńcową (Smith i wsp., 2001). Podobne zjawisko zaobserwowano u chorych z T2DM i ZM (Esposito i wsp., 2003; van Exel i wsp., 2002).

1.6 Zastosowanie DŚA w leczeniu PCOS

Terapia PCOS jest zwykle kompleksowa i obejmuje niwelowanie objawów hiperandrogenizmu (łojotok, trądzik i hirsutyzm), regulację krwawień miesięczkowych oraz przywrócenie płodności. Leczenie objawów PCOS powinno być jednak przede wszystkim uzależnione od indywidualnych oczekiwań pacjentki z uwzględnieniem jej statusu prokreacyjnego jak również zmniejszać ryzyko wystąpienia jego odległych następstw (T2DM, ChUSN). Najczęstszą metodą farmakoterapii u kobiet z PCOS nie planujących ciąży jest stosowanie DŚA, które poza przywróceniem regularnych krwawień poprzez hamowanie nadmiernego wydzielania LH i zwiększenie wątrobowej syntezy SHBG zmniejszają androgenię a co za tym idzie niwelują objawy hiperandrogenizacji. Jednocześnie znany jest fakt, iż DŚA 2-6 krotnie zwiększają ryzyko żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej

(ŻChZZ) (Lidegaard i wsp., 2009). Działanie to jest spowodowane bezpośrednim oddziaływaniem EE na hepatocyty, gdzie dochodzi do wzmożonej produkcji białek prozakrzepowych, obniżeniem aktywności antykoagulantów takich jak antytrombina i białko S oraz zmniejszeniem aktywności inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1) i wzrostem stężenia plazminogenu. Choć u większości kobiet stosujących DŚA bezwzględne ryzyko wystąpienia ŻChZZ jest niewielkie ze względu na młody wiek, to jednak ewentualne powikłania mogą stanowić poważny problem zdrowotny i społeczny. Jednocześnie ryzyko ŻChZZ może znacząco wzrosnąć u kobiet palących, otyłych, po 40 r.ż. oraz z obciążającym wywiadem rodzinnym i osobniczym (wrodzonych trombofilii). Nasuwa się pytanie czy obecność PCOS nie stanowi dodatkowego czynnika ryzyka ŻChZZ oraz czy nie jest ono zwielokrotnione przy powszechnie w tym zespole stosowanych DŚA. Innym znanym działaniem niepożądanym doustnej antykoncepcji może być wzrost wartości ciśnienia tętniczego na skutek wzmożonej syntezy angiotensynogenu w wątrobie (Oduyoye i wsp., 2015; Pimenta, 2012)

Pomimo prowadzonych badań nadal nie ma pewności, że stosowanie DŚA u kobiet z PCOS jest bezpieczne i nie nasila już istniejących zaburzeń metabolicznych w tym upośledzonej wyjściowo insulino-wrażliwości, aterogennej dyslipidemii i gotowości prozakrzepowej, prowadząc do wzrostu ryzyka rozwoju T2DM, NT i ChNS (Soares i wsp., 2009). Powyższe niekorzystne działania DŚA najprawdopodobniej zależą od dawki zawartego w nich EE oraz rodzaju składowej gestagennej. Choć stosowane obecnie preparaty zawierają minimalne dawki EE oraz tak zwane gestageny III i IV generacji, które wydają się być metabolicznie obojętne i dodatkowo mogą wywierać działanie antyandrogenne i natriuretyczne to jednak dane dotyczące ich wpływ na gospodarkę węglowodanową i lipidową u kobiet z PCOS są niejednoznaczne (Halperin i wsp., 2011). Nadal również brakuje prac oceniających wpływ wieloletniej terapii DŚA na ryzyko ChUSN.

2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu stosowania DŚA na wybrane czynniki ryzyka rozwoju ChUSN u kobiet z PCOS. Zbadano więc wpływ stosowania 6°miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na:

- klasyczne czynniki ryzyka rozwoju ChUSN takie jak BMI, obwód talii, lipidogram, gospodarkę węglowodanową oraz ciśnienie tętnicze;
- wybrane wskaźniki stanu zapalnego takie jak stężenie CRP oraz fibrynogenu w surowicy;
- wskaźniki dysfunkcji śródbłónka takie jak PWV;
- oraz surowicze stężenia cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy (MCP-1, sVCAM-1, IL-10) i zaburzeń metabolicznych (chemeryny).

3. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

3.1 Materiał badawczy i przebieg badania

Do badania zakwalifikowano 45 kobiet w wieku od 20 do 36 lat z rozpoznaniem według kryteriów rotterdamских PCOS (Rotterdam, 2004). Pacjentki pochodziły z Niepublicznej Poradni Leczenia Zaburzeń Hormonalnych, Nadciśnienia Tętniczego oraz Chorób Przemiany Materii mieszczącej się przy ul. Hryniewickiego 8C w Gdyni. Projekt pracy uzyskał zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr NKEBN/26/2011), której kopię zamieszczono w Aneksie tej pracy. Przed włączeniem do badania kandydatkom objaśniono cele oraz planowane procedury projektu, na które wyraziły pisemną zgodę. Następnie od wszystkich uczestniczek zebrano wywiad na temat stanu zdrowia, trybu życia, regularności cykli miesięczkowych, objawów hiperandrogenizmu, stosowania leków mogących wpływać na wyniki badań, ewentualnych używek oraz ChUSN w rodzinie. Zaburzenia miesięczkowania definiowano jako rzadką owulację (cykl miesięczkowy dłuższy niż co 35 dni lub mniej niż 8 cykli miesięczkowych w ciągu roku) lub brak owulacji (wtórny brak miesiączki przez okres przynajmniej 3^o miesięcy). Pacjentki poddano badaniu przedmiotowemu wraz z oceną nasilenia hirsutyizmu według skali Ferrimana-Galwey'a. Następnie między 6 a 10 dniem cyklu miesięczkowego w godzinach porannych pobrano krew na czczo. U pacjentek, którym z powodu zaburzeń miesięczkowania nie można było ustalić dnia cyklu, krew pobrano między 6 a 10 dniem po krwawieniu wywołanym podaniem 10 mg dydrogesteronu przez 10 dni. W surowicy oznaczono stężenie hormonu tyreotropowego (TSH), prolaktyny (PRL), 17 α -OH-progesteronu, testosteronu całkowitego (TST), siarczanu dihydroepiandrosteronu (DHEA-S), SHBG, androstendionu (ANDROST). Jako kliniczne lub laboratoryjne cechy hiperandrogenizmu przyjęto obecność hirsutyizmu (wskaźnik Ferrimana-Galwey'a > 8), poziom TST w surowicy > 2.7 nmol/l lub wskaźnik wolnych androgenów (FAI) > 4.5. W specjalistycznym gabinecie ginekologiczno-położniczym pacjentkom wykonano badanie ginekologiczne wraz z USG przezpochwowym przy użyciu aparatu ultrasonograficznego Medison Accuvix V20. Obraz wielotorbielowatych jajników rozpoznawano na podstawie zwiększenia objętości co najmniej jednej gonady powyżej 10 ml na skutek zwiększenia ilości jej zrębu i/lub obecności co najmniej

12 pęcherzyków o średnicy 2-9 mm, ułożonych blisko zewnętrznej powierzchni (Balen i wsp, 2003). Jednocześnie u wszystkich uczestniczek wykluczono obecność niedoczynności tarczycy, hiperprolaktynemii, wrodzonego późno ujawniającego się przerostu kory nadnerczy, zespołu Cushinga i guza wirylizującego jako potencjalnych przyczyn hiperandrogenizmu (Rachoń, 2012). Ponadto wyjściowo u wszystkich uczestniczek wykonano pomiary antropometryczne, całodobowy automatyczny pomiar wartości ciśnienia tętniczego metodą holterowską oraz badanie PWV. We wczesnej fazie folikularnej cyklu miesięczkowego poza wspomnianymi powyżej oznaczeniami hormonów oznaczono w surowicy na czczo poziom insuliny, glukozy, fibrynogenu, białka C-reaktywnego (CRP), lipidogramu. Ponadto u wszystkich pacjentek z $BMI \geq 30$ został wykonany doustny test obciążenia 75 g glukozy (DTTG 75 g). Dodatkowo część surowicy zabezpieczono i zamrożono w plastikowych probówkach w temperaturze -70°C do dalszych oznaczeń cytokin: chemeryny, MCP-1, sVCAM-1, IL-10.

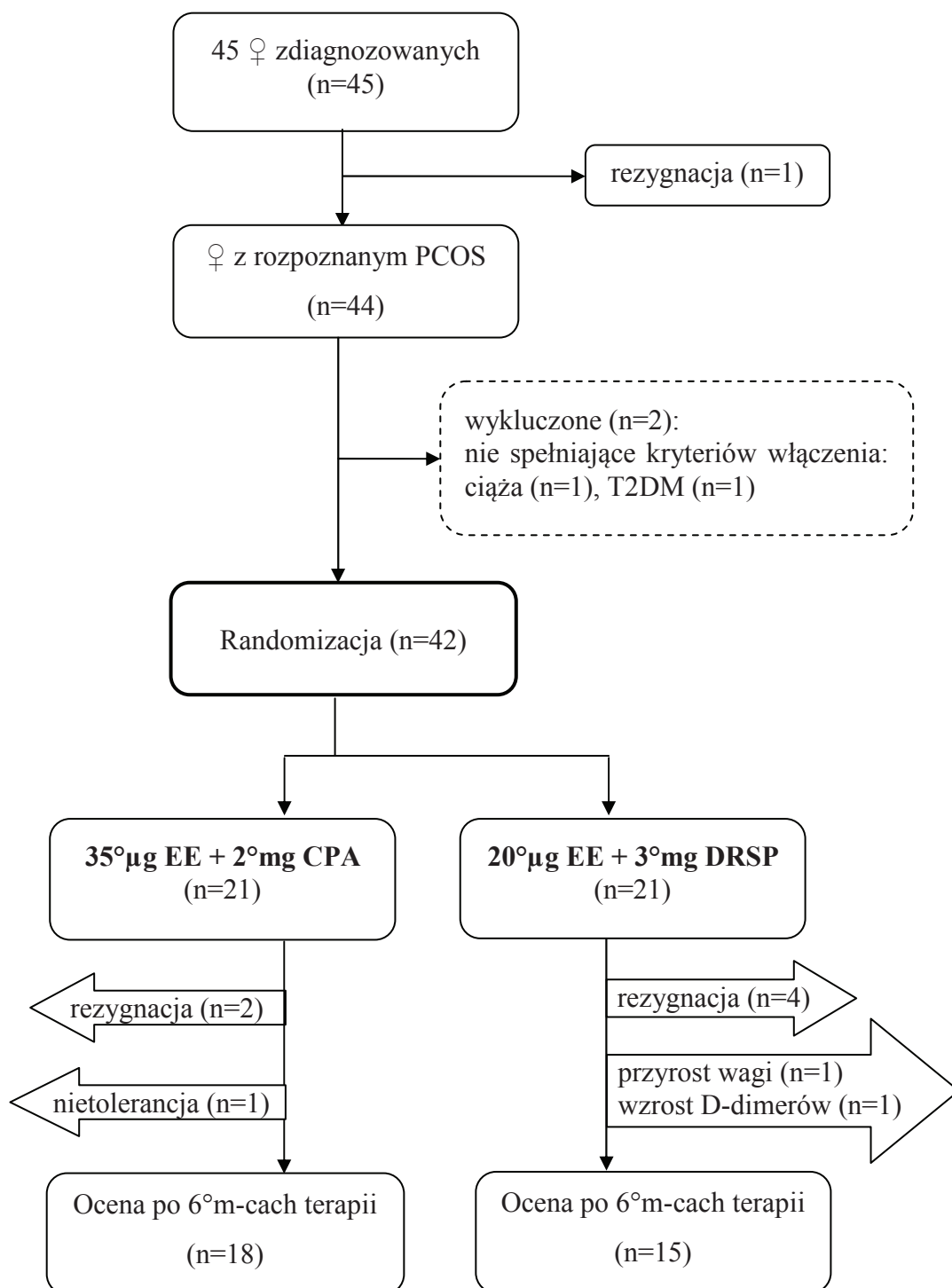
Za kryteria wykluczające udział w badaniu przyjęto:

- wiek powyżej 40 lat
- ciąża lub karmienie piersią
- obecność przewlekłych chorób zapalnych, niewyrównanej choroby tarczycy, cukrzycy, nadciśnienia tętniczego i innych ChUSN oraz chorób psychicznych w wywiadzie
- przebycie ciężkiej infekcji w ciągu ostatniego miesiąca przed randomizacją
- stosowanie DŚA w ciągu ostatnich trzech miesięcy przed randomizacją
- przyjmowanie glikokortykosteroidów, leków wpływających na ośrodkowy układ nerwowy (przeciwdepresyjne, uspokajające, psychotropowe), leków hipotensyjnych, antyhiperglikemizujących (metformina) i hipolipemizujących w ciągu ostatniego miesiąca przed randomizacją

Po wykluczeniu przeciwwskazań do stosowania doustnej antykoncepcji, pacjentki losowo przydzielono do terapii jednym z dwóch DŚA:

- grupa EE+CPA przyjmowała preparat zawierający 35 μg etynyloestradiolu i 2 mg octanu cyproteronu (nazwa handlowa: *Diane-35*, producent Schering-Bayer)
- grupa EE+DRSP przyjmowała preparat zawierający 20 μg etynyloestradiolu i 3 mg drospirenonu (nazwa handlowa: *Yaz*, producent Schering-Bayer)

Okres obserwacji wynosił 6 miesięcy. Ostatecznie z 45 uczestniczek z rozpoznaniem PCOS, które zakwalifikowano do badania przyjmowanie DŚA rozpoczęły 42 z nich (18 w grupie EE+CPA oraz 15 pacjentek w grupie EE+DRSP). Z trzech wykluczonych pacjentek jedna zrezygnowała z udziału w badaniu tuż przed jego rozpoczęciem z powodu „...braku czasu...”, u drugiej na podstawie DTTG 75 g rozpoznano cukrzycę a trzecia pacjentka przed rozpoczęciem przyjmowania DŚA zaszła w ciążę. Na Rycinie 1 przedstawiono schemat badania i udział kobiet na poszczególnych jego etapach.



Rycina 1. Schemat badania i udział kobiet na poszczególnych jego etapach.

3.2 Metody badawcze

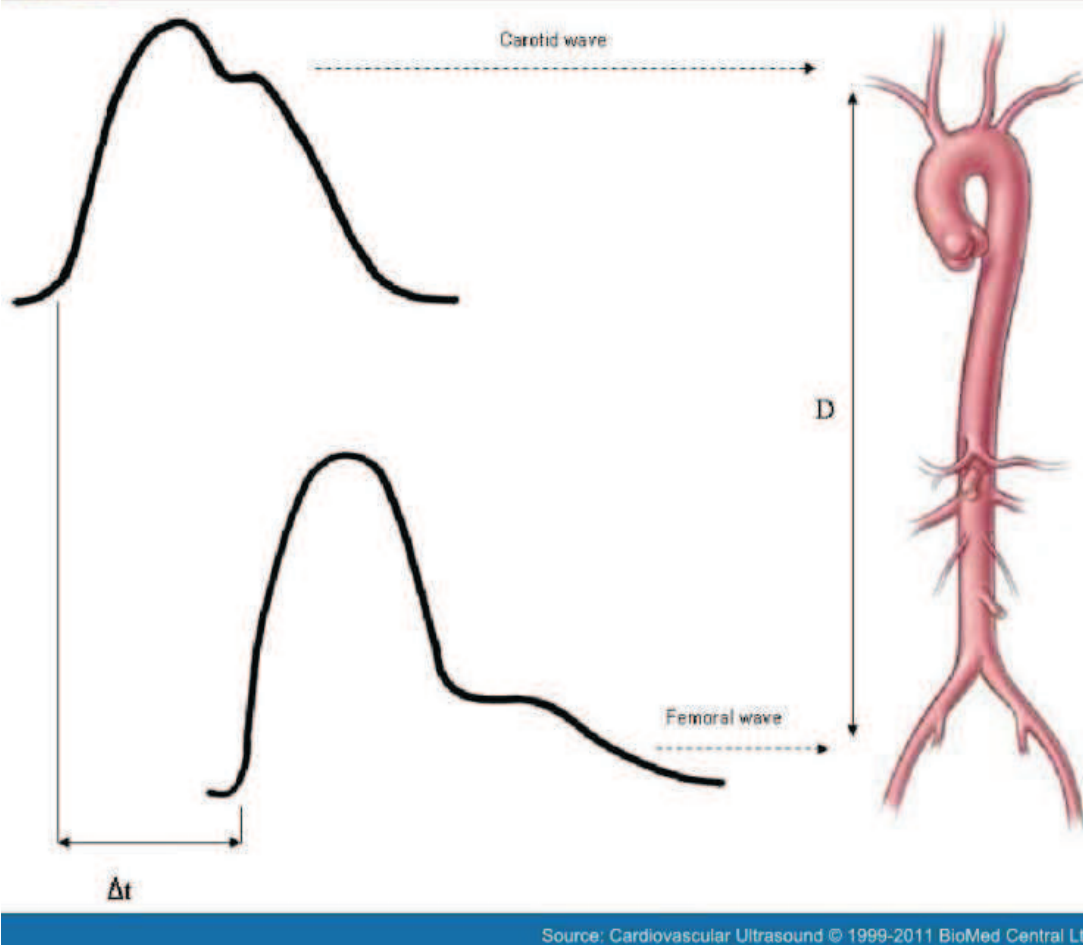
3.2.1 *Pomiary antropometryczne*

Wzrost mierzono za pomocą wzrostomierza. Pomiaru masy i składu ciała dokonano metodą bioimpedancji z wykorzystaniem elektronicznej wagi Tanita model TBF-300. Obwód talii mierzono za pomocą taśmy antropometrycznej jako najmniejszy obwód tułowia między dolnym brzegiem łuków żebrowych a górnym talerzem kości biodrowych, na wysokości wcięcia talii. Na podstawie wyżej wymienionych pomiarów wyliczono wskaźnik masy ciała (z ang. *body mass index*, BMI). Wartość BMI pomiędzy 25.0 a 29.9 zdefiniowano jako nadwagę a wartość ≥ 30.0 jako otyłość. Pomiar spoczynkowego BP wykonano zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego odpowiednio dobranym mankietem, po 15 minutach odpoczynku, na tętnicy ramiennej lewej przy zastosowaniu automatycznego aparatu oscylometrycznego OMRON M6 (Omron Healthcare Co, Japonia). Dobowego automatycznego pomiaru BP metodą holterowską dokonano przy użyciu aparatu Space Labs 90207 (Redmond, WA, Stany Zjednoczone). Pomiary ciśnienia i tętna były wykonywane co 20 minut w godzinach od 6:00 do 22:00 (okres dzienny) oraz co 30 minut w godzinach od 22:00 do 6.00 (okres nocny). Analizie poddano średnie wartości z SBP i DBP z całej doby oraz SBP i DBP z okresu dziennego i nocnego.

3.2.2 *Pomiar PWV*

Badanie prędkości przepływu fali tętna przeprowadzono w Zakładzie Nadciśnienia Tętniczego Katedry Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii GUMed (kierownik: prof. Krzysztof Narkiewicz) przy użyciu urządzenia SphygmoCor (Atcor Medical, Australia, program 8.2) wykorzystującego metodę tonometrii aplanacyjnej według wytycznych Zespołu Ekspertów do spraw badania sztywności tętnic (Laurent i wsp, 2006). Metoda ta pozwala na ciągły nieinwazyjny zapis krzywej fali tętna z tętnicy położonej powierzchownie i wyczuwalnej palpacyjnie (tętnicy szyjnej wspólnej, tętnicy promieniowej i tętnicy udowej) przy zastosowaniu sondy w kształcie długopisu z wbudowanym tonometrem. Umieszczając czujnik tonometru na skórze prostopadle do rzutu naczynia tętniczego w miejscu o najlepiej wyczuwalnym palpacyjnie tętnie rejestruje się krzywą odkształcenia ściany w czasie przechodzenia przez nią fali tętna. Badanie przeprowadzono w cichym pomieszczeniu, w pozycji leżącej na wznak, po wcześniejszym 15 minutowym odpoczynku. Pacjentkom zalecono wstrzymanie się

od spożywania posiłków, picia kawy, palenia papierosów na okres 8 godzin przed badaniem. Na początku badania wykonano pomiar ciśnienia tętniczego na tętnicy ramiennej lewej przy zastosowaniu automatycznego aparatu oscylometrycznego OMRON M6 (Omron Healthcare Co, Japonia). Następnie rejestrowano zapis fali tętna z tętnicy promieniowej prawej. Uzyskane parametry hemodynamiczne wyznaczano na podstawie analizy uśrednionych fal tętna mierzonych w 10 kolejnych cyklach. Aby dokonać pomiaru prędkości fali tętna w odcinku szyjno-udowym (cfPWV) i szyjno-promieniowym (crPWV) przeprowadzono rejestrację fali tętna odpowiednio między tętnicą szyjną wspólną i tętnicą udową oraz tętnicą szyjną wspólną i tętnicą promieniową. Odległość (D) jaką przebyła fala tętna w trakcie pomiaru cfPWV obliczano jako różnicę długości odcinka między wcięciem szyjnym mostka a punktem przyłożenia czujnika na tętnicy udowej oraz długości odcinka między wcięciem szyjnym mostka a punktem przyłożenia czujnika na tętnicy szyjnej wspólnej. Analogiczną odległość w czasie pomiaru crPWV stanowiła różnica pomiędzy długością odcinka między wcięciem szyjnym mostka a miejscem pomiaru na tętnicy promieniowej a długością odcinka między wcięciem szyjnym mostka a pomiarem na tętnicy szyjnej wspólnej. Pomiarów długości odcinków dokonywano taśmą mierniczą. Jednocześnie rejestrowano trój - odprowadzeniowy zapis EKG. Program komputerowy na podstawie różnicy pomiędzy czasem wystąpienia skurczowej fali ciśnienia a czasem wystąpienia załamka R odpowiadającej mu ewolucji serca w zapisie EKG wyznaczał opóźnienie, które wraz z odległością między miejscami w których wykonano pomiar służył do wyliczenia prędkości propagacji fali tętna. Prędkość fali tętna wyrażano w metrach na sekundę (m/s).



Rycina 2. Prędkość fali tętna (PWV) w odcinku szyjno-udowym (na podstawie Cardiovascular Ultrasound 1999-2011 BioMed Central Ltd), gdzie D - odległość, Carotid wave - fala tętna na tętnicy szyjnej wspólnej, Femoral wave - fala tętna na tętnicy udowej, $PWV = D/\Delta t$

3.2.3 Oznaczenia laboratoryjne

Do wykonania oznaczeń laboratoryjnych pobrano na czczo z żyły łokciowej krew żylną przy użyciu systemu próżniowego (15 ml do probówki bez antykoagulantu oraz 5 ml do probówki z EDTA). Wszystkie badania laboratoryjne wykonano w Laboratorium Medycznym BRUSS Grupy ALAB sp. z o.o. mieszczącym się przy ul. Powstania Styczniowego 9B w Gdyni przy użyciu komercyjnych zestawów analitycznych. Stężenia cholesterolu całkowitego, frakcji HDL, frakcji LDL oraz triglicerydów oznaczono enzymatyczną metodą kolorymetryczną przy użyciu zestawów firmy Roche Diagnostics-Cobas. Poziom glukozy oznaczono metodą spektrofotometryczną heksokinazową także przy użyciu zestawów firmy Roche Diagnostics-Cobas. Do oznaczenia CRP wykorzystano metodę immunoturbidimetrii

(zestawy firmy Roche Diagnostics-Cobas). Metodą elektrochemiluminescencji (ECLIA) oznaczono stężenia insuliny, TSH, PRL, TST, DHEA-S (zestawy firmy Roche Diagnostics-Cobas) oraz metodą CLIA-chemiluminescencji stężenie fibrynogenu i androstendionu (zestawy firmy Roche Diagnostics-Cobas). Stężenie 17α -OH-progesteronu oznaczono przy pomocy metody radioimmunologicznej (RIA) z wykorzystaniem zestawów firmy Siemens. Do oznaczenia stężenia SHBG wykorzystano dwuetapowy test immunoenzymatyczny typu sandwich przy użyciu zestawów firmy Beckman Coulter-Access2. Na podstawie wartości TST i SHBG wyliczono wskaźnik wolnych androgenów (FAI) jako $[TST \text{ (nmol/l)} / SHBG \text{ (nmol/l)}] \times 100$.

3.2.4 *Uzyskiwanie surowic do oznaczeń cytokin*

Krew pobrana do probówki z żelą separacyjnym („na skrzep”) po odstaniu w temperaturze pokojowej przez około 60 minut odwirowywano przez 15 minut przy prędkości 2 500 obrotów/minutę. Uzyskaną w ten sposób surowicę rozdzielono po 1 ml do czterech probówek typu Eppendorf o pojemności 1.5 ml. Próbkę zamrożono i przechowywano w temperaturze -70°C do dalszych oznaczeń.

3.2.5 *Oznaczanie stężenia cytokin w zebranych próbkach surowicy*

Oznaczenia stężeń badanych cytokin wykonano w Zakładzie Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej GUMed. Każdy z zestawów zawierał 96 dołkową płytkę opłaszczoną przeciwciałami przeciwko danej cytokinie. Przepłukiwanie dołków wykonywano automatycznie stosując rozcieńczony roztwór do płukania załączony przez producenta (*Wash Buffer*).

IL-10

Preparat ludzkiej rekombinowanej IL-10 (*IL-10 Standard*) rozpuszczono, a następnie rozcieńczono zgodnie z instrukcją używając zawartego w zestawie roztworu, aby uzyskać malejące standardowe stężenia IL-10. Do dołków nałożono po 100 μL przygotowanych standardów i badanych surowic. Płytkę inkubowano na wytrząsarce przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie wszystkie dołki przepłukiwano 4 razy. Po dodaniu do każdego dołka po 200 μL przeciwciała anty-IL-10 (*IL-10 Conjugate*) płytkę ponownie inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po czterokrotnym płukaniu dodano po 200 μL

przygotowanego uprzednio roztworu substratu (*Substrate Solution*), który uzyskano po połączeniu równych objętości enzymu (*Stabilized Hydrogen Peroxide*) i roztworu barwnego substratu (*Stabilized Chromogen*). Tak przygotowaną płytkę inkubowano w ciemni przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Absorbancję produktu barwnego reakcji enzymatycznej po dodaniu roztworu kwasu solnego (*Stop Solution*) oceniano przy długości fali 450 nm. Na podstawie absorbancji w dołkach zawierających kolejne standardy obliczono stężenia IL-10 w próbkach badanych i kontrolnych z uwzględnieniem wyjściowego rozcieńczenia surowic.

MCP-1

Przygotowany przez producenta preparat (*MCP-1 Standard*) rozpuszczono przy użyciu zawartego w zestawie roztworu (*Calibrator Diluent RD 6Q*), a następnie rozcieńczono zgodnie z podanymi zasadami uzyskując malejące standardowe stężenia MCP-1. Do wszystkich dołków dodano po 50 μ L buforu do inkubacji, a następnie nałożono po 200 μ L standardów oraz rozcieńczonych dwukrotnie buforem surowic badanych i kontrolnych. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie wszystkie dołki przepłukiwano 4 razy. Po dodaniu do każdego dołka po 200 μ L przeciwciała anti-MCP-1 (*MCP-1 Conjugate*) płytkę ponownie inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej umożliwiając połączenie MCP-1 z przeciwciałami, a następnie ponownie wszystkie dołki przepłukiwano 4 razy. W kolejnym etapie do dołków dodano po 200 μ L przygotowanego uprzednio roztworu substratu (*Substrate Solution*), który uzyskano po połączeniu równych objętości enzymu (*Stabilized Hydrogen Peroxide*) i roztworu barwnego substratu (*Stabilized Chromogen*). Tak przygotowaną płytkę inkubowano w ciemni przez 30 minut w temperaturze pokojowej, po czym reakcje przerywano przy użyciu roztworu kwasu (*Stop Solution*). Absorbancję produktu barwnego reakcji enzymatycznej oceniano przy długości fali 450 nm. Na podstawie absorbancji w dołkach zawierających kolejne standardy obliczono stężenia MCP-1 w próbkach badanych i kontrolnych z uwzględnieniem wyjściowego (dwukrotnego) rozcieńczenia surowic.

sVCAM-1

Przygotowany przez producenta preparat (*sVCAM-1 Standard*) rozpuszczono w wodzie destylowanej, a następnie rozcieńczono zgodnie z podanymi zasadami przy użyciu zawartego w zestawie roztworu (*Calibrator Diluent RD5P*) uzyskując

malejące standardowe stężenia sVCAM-1. Próbkę surowic rozcieńczono buforem w stosunku 1:20. Do dołków nałożono po 100 μ L skoniugowanych z peroksydazą chrzanową przeciwciał anty-sVCAM-1 (*sVCAM-1 Conjugate*), a następnie dodano także po 100 μ L przygotowanych standardów, surowic badanych i kontrolnych. Płytkę inkubowano na wytrząsarce przez 1.5 godziny w temperaturze pokojowej. Po czterokrotnym płukaniu usuwającym nadmiar niezwiązanych substancji do dołków dodano po 100 μ L przygotowanego uprzednio roztworu substratu (*Substrate Solution*), który uzyskano po połączeniu równych objętości enzymu (*Stabilized Hydrogen Peroxide*) i roztworu barwnego substratu (*Stabilized Chromogen*). Tak przygotowaną płytkę inkubowano w ciemni przez 20 minut w temperaturze pokojowej, po czym reakcję przerywano dodając 50 μ L roztworu kwasu (*Stop Solution*). Absorbancję produktu barwnego reakcji enzymatycznej oceniano przy długości fali 450 nm. Na podstawie absorbancji w dołkach zawierających kolejne standardy obliczono stężenia sVCAM-1 w próbkach badanych i kontrolnych uwzględniając wyjściowe rozcieńczenie badanych surowic.

Chemeryna

Przygotowany przez producenta preparat (*Chemerin Standard*) rozpuszczono w wodzie destylowanej, a następnie rozcieńczono zgodnie z podanymi zasadami przy użyciu zawartego w zestawie roztworu (*Calibrator Diluent RD5-26 Concentrate*) uzyskując malejące standardowe stężenia chemeryny. Próbkę surowic rozcieńczono buforem w stosunku 1:100. Do dołków nałożono po 100 μ L załączonego w zestawie roztworu (*Assay Diluent RDI-21*) oraz po 50 μ L przygotowanych uprzednio standardów, surowic badanych i kontrolnych. Płytkę inkubowano na wytrząsarce (500 rpm) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie wszystkie dołki przepłukiwano 4 razy. Po dodaniu do każdego dołka po 200 μ L przeciwciał anty-Chemerin związanych z peroksydazą chrzanową (*Chemerin Conjugate*) płytkę ponownie inkubowano na wytrząsarce przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie po czterokrotnym płukaniu usuwającym nadmiar konjugatu dodano do dołków po 200 μ L przygotowanego uprzednio roztworu substratu (*Substrate Solution*), który uzyskano po połączeniu równych objętości enzymu (*Stabilized Hydrogen Peroxide*) i roztworu barwnego substratu (*Stabilized Chromogen*). Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej bez dostępu światła, reakcje

przerwano po dodaniu 50 μ L roztworu kwasu (*Stop Solution*). Absorbancję produktu barwnego reakcji enzymatycznej oceniano natychmiast przy długości fali 450 nm. Na podstawie absorbancji w dołkach zawierających kolejne standardy obliczono stężenia chemeryny w próbkach badanych i kontrolnych uwzględniając wyjściowe rozcieńczenie badanych surowic.

3.2.6 Ocena insulinooporności/insulinowrażliwości

Celem oceny IR wykorzystano wskaźniki insulinooporności/insulinowrażliwości oparte na pomiarze stężenia glukozy i insuliny na czczo w surowicy krwi żyłnej, które przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wskaźniki insulinooporności/insulinowrażliwości.

wskaźnik insulinooporności/insulinowrażliwości	metoda pomiaru	wartość zalecana
Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)	poziom insuliny na czczo (μ U/mL) x poziom glukozy na czczo (mmol/L) / 22.5	< 2.77
Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI)	$1 / [\log (\text{poziom insuliny na czczo } (\mu\text{U/mL}) + \log (\text{poziom glukozy na czczo } (\text{mg/dL}))]$	> 0.357
glucose / insulin ratio (FGIR)	poziom glukozy na czczo (mg/dl) / poziom insuliny na czczo (μ U/MI)	> 4.5

Ponadto wyliczono również stosunek surowiczych stężeń triglicerydów do surowiczych stężeń cholesterolu frakcji HDL (TG/HDL-cho). Wartość wskaźnika powyżej 3 może służyć jako wskaźnik insulinooporności.

3.2.7 Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA wersja 10. Hipotezę założenia normalności rozkładu badanych zmiennych weryfikowano testem W Shapiro i Wilka. W przypadku zmiennych spełniających założenie normalności rozkładu za miarę tendencji centralnej przyjęto średnią arytmetyczną, a za miarę rozproszenia odchylenie standardowe (SD). Dla zmiennych wyrażonych w skali interwałowej (wskaźnik Ferrimana-Galwey'a) za miarę tendencji centralnej i rozproszenia przyjęto odpowiednio medianę oraz rozstęp międzykwartylowy (Q1-Q3). Porównania grup przed rozpoczęciem terapii dokonano przy użyciu testu t-Studenta dla dwóch grup niezależnych. Zmienne niespełniające założenia normalności rozkładu poddawano transformacji logarytmicznej. W przypadku zmiennych niespełniających założenia normalności

rozkładu mimo transformacji logarytmicznej użyto testów nieparametrycznych. W celu porównania dwóch grup przed rozpoczęciem terapii zastosowano test U Manna-Whitney'a. Testem tym porównywano również wyjściowe wartości wskaźnika F-G. Analizy istotności różnic pomiędzy zmiennymi przed i po 6 miesiącach obserwacji dokonano przy użyciu ANOVA dla pomiarów powtarzalnych. Analizy *post-hoc* przeprowadzono przy użyciu testu Tukeya. Analiza zmiennych niespełniających założenia normalności rozkładu mimo transformacji logarytmicznej była przeprowadzona testem Kruskala-Wallisa, a analizy *post-hoc* testem U Manna-Whitney'a. Analizy istotności różnic przed i po dwóch rodzajach terapii były przeprowadzone przy użyciu ANOVA dla pomiarów powtarzalnych. Założenie o jednorodności wariancji sprawdzono testem Levene'a. Do analizy *post-hoc* użyto testu Tukeya. W przypadku zmiennych niespełniających założenia normalności rozkładu mimo transformacji logarytmicznej zastosowano test kolejności par Wilcozona. Testem tym porównywano również zmienne zebrane w skali interwałowej. Porównanie istotności różnic proporcji przed i po terapii wykonano przy użyciu testu McNemary. W celu oceny współzależności pomiędzy zmiennymi wyliczono wartość współczynnika korelacji liniowej Pearsona lub nieliniowego współczynnika korelacji rang Spearmana. Zmienne, które nie spełniały założenia normalności rozkładu przed analizą korelacji liniowej także poddawano transformacji logarytmicznej. Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0.05$.

4. WYNIKI

4.1 Charakterystyka badanych kobiet

Ostatecznie w badaniu wzięły udział 42 pacjentki w wieku od 20 do 36 lat z rozpoznaniem według kryteriów rotterdamskich PCOS. Wszystkie pacjentki pochodziły z terenu województwa pomorskiego. Na podstawie wywiadu ustalono, że zaburzenia miesiączkowania o typie *oligomenorrhea* występowały u 62 % kobiet (n=26), *amenorrhea* u 17 % kobiet (n=7). Regularne krwawienia miesiączkowe obserwowało 21 % pacjentek (n=9). Znacząca większość zakwalifikowanych pacjentek (98 %, n=41) prezentowała kliniczne lub laboratoryjne cechy hiperandrogenizmu. Typowy obraz PCOM w badaniu ultrasonograficznym stwierdzono u 60 % kobiet (n=25). Ustalono, iż najczęściej występującym fenotypem wśród badanych kobiet był fenotyp HO (hiperandrogenizm, oligoanowulacja) prezentowany przez 40 % pacjentek (n=17). U 33 % kobiet (n=14) występował fenotyp PHO (PCOM, hiperandrogenizm, oligoanowulacja), u 24 % fenotyp HP (hiperandrogenizm, PCOM), a tylko u jednej uczestniczki (n=2 %) fenotyp OP (oligoanowulacja, PCOM). W pomiarach antropometrycznych u większości badanych pacjentek (71.5 %; n=30) stwierdzono prawidłową masę ciała ($BMI < 25$). Podwyższony wskaźnik BMI występował u 28.5 % kobiet, przy czym nadwagę ($BMI \geq 25$ i < 30) rozpoznano u 19 % (n=8) a otyłość ($BMI \geq 30$) u 9.5 % (n=4) kobiet. Ponadto 2 pacjentki (4.8 %) spełniały kryteria rozpoznania ZM zgodne zarówno według kryteriów III Raportu Zespołu Specjalistów Narodowego Programu Edukacji Cholesterolowej z 2002r. (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III, NCEP-ATP III*), jak i kryteriów Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej z 2005r. (*International Diabetes Federation, IDF*) oraz najnowszą definicją ZM według wspólnych zaleceń międzynarodowych i amerykańskich towarzystw diabetologicznych i kardiologicznych z 2009r. (tzw. *Joint definition*). Najczęstszą składową ZM była otyłość centralna (obwód pasa ≥ 80 cm). Kryterium to spełniało 36 % badanych kobiet z PCOS (n=15). U żadnej z zakwalifikowanych do terapii DŚA pacjentek nie stwierdzono nieprawidłowej glikemii na czczo (> 100 mg/dl). Ponadto wykonany u kobiet z nadwagą i otyłością DTTG 75 g również nie wykazał odchylen w poziomie glikemii na czczo i po obciążeniu 75 g glukozy.

Natomiast, jak już wspomniano wcześniej, jedna pacjentka z powodu rozpoznanej IFG i T2DM na podstawie DTTG 75 g została wykluczona z badania.

Ponadto spośród innych składowych ZM poziom triglicerydów przekraczający 150 mg/dl stwierdzono u 9.5 % kobiet (n=4) a obniżony poziom cholesterolu frakcji HDL u 19 % kobiet (n=8). Skurczowe ciśnienie tętnicze wyższe niż 130 mmHg występowało u 4.8 % pacjentek (n=2) a rozkurczowe ciśnienie tętnicze wyższe niż 85 mmHg u 2.4 % (n=1). W Tabeli 2 przedstawiono charakterystykę badanych kobiet po losowym ich zakwalifikowaniu do dwóch grup (EE+CPA i EE+DRSP).

Tabela 2. Charakterystyka badanych kobiet zakwalifikowanych do terapii dwoma różnymi DŚA (EE+CPA lub EE+DRSP).

	35 µg EE + 2 mg CPA (n=21)	20 µgEE + 3 mg DRSP (n=21)	wartość P
Wiek (lata)	24.9 ± 4.4	25.3 ± 3.7	0.734
BMI	23.4 ± 3.8	23.9 ± 4.5	0.667
Stopień nasilenia hirsutyizmu w skali F-G	15 (7 – 21)	11 (10 – 25)	0.554
Obwód talii (cm)	77.5 ± 8.6	80.4 ± 11.7	0.416
Masa ciała (kg)	66.0 ± 12.7	68.0 ± 12.7	0.639
Masa tk. tłuszczowej (kg)	19.7 ± 8.8	20.7 ± 9.8	0.725
Masa tk. mięśniowej (kg)	43.9 ± 4.0	44.8 ± 3.5	0.444
Beztłuszczowa masa ciała (kg)	46.4 ± 4.5	47.2 ± 3.5	0.534
Zawartość wody w organizmie (%)	50.4 ± 4.6	50.3 ± 5.2	0.957
TST (nmol/l)	1.7 ± 0.7	2.1 ± 1.3	0.224
ANDRO (ng/ml)	3.2 ± 0.9	3.8 ± 1.5	0.147
SHBG (nmol/l)	76.4 ± 44.0	67.3 ± 25.2	0.484
FAI	3.0 ± 2.7	3.5 ± 1.7	0.577
TCh (mg/dl)	191.5 ± 31.3	195.6 ± 37.5	0.717
HDL-Ch (mg/dl)	60.8 ± 12.9	61.0 ± 15.2	0.973
LDL-Ch (mg/dl)	112.1 ± 25.9	114.8 ± 34.9	0.781
TG (mg/dl)	92.9 ± 44.9	98.8 ± 45.2	0.688
Glikemia (mg/dl)	85.0 ± 6.0	88.1 ± 6.4	0.123
Insulinemia (IU/L)	8.4 ± 4.0	9.8 ± 7.7	0.495
Wsk. HOMA-IR	1.8 ± 0.9	1.8 ± 0.9	0.948
Wsk. QUICKI	0.3 ± 0.03	0.4 ± 0.04	0.728
FGIR	12.6 ± 0.3	16.2 ± 0.7	0.318
SBP (mmHg) w ciągu doby	110.9 ± 5.2	112.9 ± 10.7	0.451
DBP (mmHg) w ciągu doby	69.7 ± 4.7	72.1 ± 8.1	0.273
HR w ciągu doby	72.7 ± 8.3	76.4 ± 6.7	0.138
PWV (m/s)	7.2 ± 1.2	7.2 ± 0.8	0.900
CRP (mg/l)	0.9 ± 0.7	1.0 ± 0.7	0.667
Fibrynogen (g/l)	2.8 ± 0.4	3.0 ± 0.7	0.539
PCOM (%)	11/21 (52%)	14/21 (67%)	0,346
PCOM – obraz wielotorbielowatych jajników w badaniu USG TV (z ang. Polycystic Ovary Morphology)			

Jak wynika z powyższej Tabeli po losowym zakwalifikowaniu pacjentek do leczenia określonym preparatem doustnej antykoncepcji grupy te (EE+CPA i EE+DRSP) nie różniły się wyjściowo zarówno pod względem wieku, parametrów antropometrycznych, wartości ciśnienia tętniczego, akcji serca oraz parametrów hormonalno-metabolicznych.

4.2 Ocena i porównanie wpływu stosowania 6^omiesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane czynniki ryzyka rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego u kobiet z PCOS

Leczenie dwoma różnymi DŚA rozpoczęły 42 kobiety z PCOS. Wyjściowo liczebność pacjentek w obu grupach była jednakowa (n=21). Ostatecznie sześciomiesięczny okres leczenia ukończyło 18 kobiet w grupie EE+CPA oraz 15 kobiet w grupie EE+DRSP. Około 7 % pacjentek (n=3) zaprzestało przyjmowanie DŚA z powodu objawów niepożądanych. U jednej pacjentki przyjmującej preparat EE+CPA doszło do wystąpienia uczuleniowych zmian skórnych (osutki polekowej). Natomiast w grupie EE+DRSP przyczyną przerwania terapii był znaczny przyrost wagi (n=1) oraz obawa przed zakrzepicą (w wykonanym przez pacjentkę badaniu stężenia D-dimerów w surowicy zaobserwowano ich wzrost). Z innych objawów niepożądanych towarzyszących terapii DŚA najczęściej występowały wahania nastroju, spadek libido i suchość błony śluzowej pochwy (częściej w grupie EE+CPA), jednakże nie były one przyczyną zaprzestania terapii. Ponadto 14 % kobiet (n=6) zrezygnowało z udziału w badaniu w trakcie jego trwania bez podania przyczyny.

4.2.1 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na BMI, obwód talii i skład ciała badanych kobiet

Dokładna analiza 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA wykazała, że w grupie EE+CPA nie doszło do istotnych zmian w BMI, obwodzie talii i składzie ciała. Natomiast w grupie EE+DRSP zaobserwowano znamienny wzrost masy całkowitej tkanki tłuszczowej. Wzrost ten korespondował w tej grupie pacjentek ze wzrostem masy ciała, który także się zwiększył, lecz różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej ($p=0.08$). Ponadto w grupie EE+DRSP zaobserwowano znamienny spadek procentowej zawartości wody w organizmie co można tłumaczyć natriuretycznym działaniem DRSP. Procentowa analiza zmian w poszczególnych parametrach składu ciała również wykazała, że kobiety z PCOS przyjmujące preparat EE+DRSP po 6 miesiącach miały średnio o 2.5 % większe BMI ($p=0.05$) oraz 2.3 % większą masę ciała ($p=0.06$) w stosunku do wartości wyjściowych. Wyniki dotyczące BMI, obwodu talii i składu ciała przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na BMI, obwód talii i skład ciała.

Zmienna	35 µg EE + 2 mg CPA (n=18)			20 µg EE + 3 mg DRSP (n=15)		
	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)
BMI	23.2 ± 3.8	23.1 ± 3.7	- 0.1 (-0.5; 0.2)	23.5 ± 4.1	24.0 ± 3.9	0.5 (-0.1; 1.2)
Obwód talii (cm)	77.6 ± 8.6	77.1 ± 7.9	- 0.5 (-2.8; 1.8)	79.0 ± 9.9	79.5 ± 8.8	0.5 (-3.0; 4.1)
Masa ciała (kg)	66.2 ± 11.6	65.9 ± 10.9	- 0.3 (-1.2; 0.6)	66.7 ± 11.2	68.0 ± 10.7 [§]	1.4 (-0.2; 2.9)
Masa tkanki tłuszczowej (kg)	19.7 ± 8.2	19.5 ± 6.6	- 0.2 (-1.5; 1.2)	19.7 ± 8.6	21.0 ± 8.3 *	1.2 (-0.2; 2.3)
Masa tkanki mięśniowej (kg)	43.4 ± 3.7	43.4 ± 4.3	- 0.6 (-1.0; 0.9)	44.7 ± 3.3	44.5 ± 3.2	- 0.16 (-1.1; 0.8)
Beztłuszczowa masa ciała (kg)	46.5 ± 4.2	46.4 ± 4.9	- 0.1 (-1.0; 0.8)	46.8 ± 3.3	46.7 ± 3.2	- 0.1 (-0.9; 0.7)
Zawartość wody w organizmie(%)	50.4 ± 4.5	50.3 ± 3.5	- 0.1 (-1.1; 0.9)	50.6 ± 4.7	49.8 ± 4.6 *	- 0.8 (-1.4; 0.2)
EE – etynyloestradiol, CPA – octan cyproteronu, DRSP – drospirenon, 6 m – sześć miesięcy, 95% CI – 95% przedział ufności, BMI – wskaźnik masy ciała [§] $p=0.08$						

4.2.2 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na laboratoryjne wskaźniki androgenemii

Zarówno u kobiet przyjmujących preparat EE+CPA jak i preparat EE+DRSP przez okres 6 miesięcy zaobserwowano znamieny spadek surowiczego stężenia TST oraz ANDRO. Nie wykazano, aby rodzaj stosowanego preparatu miał przewagę i w większym stopniu wpływał na obniżenie stężenia powyższych parametrów. Obydwa preparaty znamienne podwyższały surowicze stężenia SHBG co wraz ze spadkiem surowiczych stężeń testosteronu w konsekwencji doprowadziło do znamienego spadku FAI w obydwu grupach. Wyniki przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na wskaźniki androgenemii.

Zmienna	35 µg EE + 2 mg CPA (n=18)			20 µg EE + 3 mg DRSP (n=15)		
	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)
TST (nmol/l)	1.62 ± 0.60	0.82 ± 0.57 *	- 0.80 (-1.07; -0.53)	2.28 ± 1.40	1.07 ± 0.41 *	-1.21 (-1.90; -0.52)
ANDRO (ng/ml)	3.08 ± 0.96	1.94 ± 0.92 *	- 1.14 (-1.70; -0.57)	3.71 ± 1.52	2.21 ± 0.69 *	-1.50 (-2.46; -0.53)
SHBG (nmol/l)	76.4 ± 43.9	178.1 ± 7.7 *	107.7 (89.6; 125.9)	67.3 ± 25.2	170.2 ± 26.2 *	102.8 (78.4; 127.3)
FAI	3.03 ± 2.74	0.46 ± 0.31 *	- 2.57 (-3.92; -1.22)	3.49 ± 1.74	0.65 ± 0.28 *	- 2.83 (-3.75; -1.92)

EE – etynyloestradiol, CPA – octan cyproteronu, DRSP – drospirenon, TST – testosteron całkowity, ANDRO – androstendion, SHBG – białko wiążące hormony płciowe, FAI – wskaźnik wolnych androgenów, 6 m – sześciu miesiącach, 95% CI – 95% przedział ufności
 * różnica znamienna statystycznie w stosunku do wartości przed włączeniem leku (p<0.05)

4.2.3 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na wartości ciśnienia tętniczego oraz akcji serca

U pacjentek z PCOS przyjmujących preparat EE+CPA zaobserwowano znamieny wzrost dobowych wartości ciśnienia tętniczego zarówno skurczowego jak i rozkurczowego oraz przyspieszenie akcji serca w ciągu doby. Nie odnotowano natomiast znamienych różnic w wysokości skurczowego ciśnienia tętniczego w ciągu dnia i akcji serca w godzinach nocnych. W grupie EE+DRSP nie zaobserwowano zmian w dobowych wartościach ciśnienia tętniczego i akcji serca.

Wyniki przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na dobowe wartości ciśnienia tętniczego oraz akcji serca.

średnie wartości BP oraz HR	35 µg EE + 2 mg CPA (n=18)			20 µg EE + 3 mg DRSP (n=15)		
	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)
SBP (mmHg) w ciągu doby	110 ± 6	114 ± 7 *	3 (0; 5)	112 ± 9	112 ± 9	1 (-3; 4)
DBP (mmHg) w ciągu doby	70 ± 5	74 ± 6 *	4 (1; 7)	71 ± 7	72 ± 6	1 (-2; 4)
HR w ciągu doby	73 ± 9	79 ± 10 *	5 (1; 10)	76 ± 8	78 ± 10	2 (-3; 7)
SBP (mmHg) w ciągu dnia	115 ± 6	117 ± 6	2 (-1; 4)	117 ± 10	117 ± 10	0 (-4; 5)
DBP (mmHg) w ciągu dnia	74 ± 5	76 ± 5 *	3 (0; 5)	75 ± 8	77 ± 6	1 (-2; 5)
HR w ciągu dnia	78 ± 9	83 ± 10 *	5 (1; 9)	81 ± 10	83 ± 9	1 (-4; 7)
SBP (mmHg) w godz. nocnych	102 ± 6	107 ± 10 *	5 (1; 9)	101 ± 8	103 ± 10	2 (-1; 5)
DBP (mmHg) w godz. nocnych	62 ± 6	66 ± 8 *	4 (1; 7)	61 ± 5	63 ± 8	2 (-2; 6)
HR w godz. nocnych	64 ± 9	67 ± 8	3 (-1; 7)	65 ± 6	68 ± 11	3 (-4; 10)
EE – etynyloestradiol, CPA – octan cyproteronu, DRSP – drospirenon, 6 m – sześciu miesiącach, 95% CI – 95% przedział ufności, BP – ciśnienie tętnicze, SBP – skurczowe ciśnienie tętnicze, DBP – rozkurczowe ciśnienie tętnicze, HR – akcja serca (liczba uderzeń/min) * różnica znamienista statystycznie w stosunku do wartości przed włączeniem leku (p<0.05)						

Kolejnym krokiem była próba odpowiedzi na pytanie który z czynników humoralnych mógł mieć wpływ na obserwowane zmiany w średnich wartościach ciśnienia dobowego w grupie EE+CPA. W tym celu dokonano analizy korelacji zmian ciśnienia tętniczego w ciągu całej doby oraz osobno w ciągu dnia i nocy z obserwowanymi zmianami w poziomie insulinemii, wskaźników insulinooporności/insulinowrażliwości oraz wskaźników androgenemii. W wyniku przeprowadzonej analizy wykazano znamienną statystycznie ujemną korelację pomiędzy wzrostem SBP w ciągu dnia a wskaźnikami insulinowrażliwości QUICKI ($r = -0.86$, $p=0.013$) i FGIR ($r = -0.90$, $p=0.006$). Ponadto wykazano znamienną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy wzrostem SBP w nocy a zmniejszeniem się stężenia TST w surowicy w grupie EE+CPA ($R=0.76$, $p=0.046$). Nie stwierdzono natomiast aby obserwowany podczas terapii preparatem EE+CPA wzrost akcji serca korelował z którymkolwiek badanym parametrem humoralnym.

4.2.4 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na profil lipidowy oraz parametry gospodarki węglowodanowej

U pacjentek z PCOS przyjmujących preparat EE+CPA przez okres 6 miesięcy zaobserwowano znamienny wzrost stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy oraz wzrost stężenia cholesterolu frakcji HDL. Różnica ta była jednak na granicy znamienności statystycznej ($p=0.05$). W grupie EE+DRSP nie zaobserwowano wzrostu surowiczych stężeń cholesterolu frakcji HDL ($p=0.79$). W obydwu grupach odnotowano znamienny wzrost stężenia triglicerydów w surowicy. Ponadto w grupie EE+CPA zaobserwowano także znamienny wzrost surowiczych stężeń insuliny, podczas gdy w grupie EE+DRSP zmiana ta nie była istotna statystycznie ($p=0.40$). Niemniej jednak w obydwu grupach stwierdzono znamienne różnice w wartościach wszystkich trzech wskaźników insulinooporności/insulinowrażliwości. Zaobserwowano znamienny wzrost wartości wskaźnika HOMA-IR oraz stosunku TG/HDL-Ch zarówno w grupie przyjmującej preparat EE+CPA jak i EE+DRSP oraz znamienny spadek wartości wskaźników QUICKI oraz FGIR. Obserwowane zmiany były porównywalne w obydwu grupach pacjentek i nie zależały od rodzaju stosowanego środka antykoncepcyjnego. Wyniki dotyczące wpływu stosowanych preparatów doustnej antykoncepcji na profil lipidowy i parametry gospodarki węglowodanowej przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane parametry profilu lipidowego i gospodarki węglowodanowej.

Zmienna	35 µg EE + 2 mg CPA (n=18)			20 µg EE + 3 mg DRSP (n=15)		
	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)
TCh (mg/dl)	190 ± 32	214 ± 30 *	23 (6; 41)	189 ± 39	193 ± 32	4 (-7; 15)
HDL-Ch (mg/dl)	61 ± 13	65 ± 12 *	4 (0; 8)	60 ± 13	60 ± 12	1 (-6; 7)
LDL-Ch (mg/dl)	111 ± 27	119 ± 32	8 (-7; 23)	110 ± 37	106 ± 34	-4 (-13; 6)
TG (mg/dl)	90 ± 39	146 ± 48 *	56 (37; 75)	98 ± 43	134 ± 28 *	36 (10; 61)
TG/HDL-Ch	1.56 ± 0.8	2.36 ± 1.0 *	0.8 (0.4; 1.2)	1.7 ± 0.9	2.29 ± 0.6 *	0.6 (0.1; 1.0)
Glikemia (mg/dl)	84 ± 6	84 ± 5	4 (-6; 15)	88 ± 6	88 ± 5	7 (-10; 24)
Insulinemia (IU/L)	8.4 ± 4.2	11.2 ± 5 *	2.8 (1.3; 4.0)	9.8 ± 8	11.4 ± 5	1.7 (-2.5; 6.0)
HOMA-IR	1.8 ± 1.0	2.4 ± 1.2 *	0.6 (-0.25; 0.9)	1.6 ± 0.9	2.7 ± 0.9 *	1.07 (0.4; 1.7)
QUICKI	0.36 ± 0.03	0.34 ± 0.02 *	-0.01 (-0.03; 0)	0.37 ± 0.05	0.33 ± 0.02 *	-0.04 (-0.07; 0)
FGIR	12.42 ± 0.35	9 ± 0.22 *	-0.19 (-0.33; -0.05)	17.64 ± 0.74	8.28 ± 0.20 *	-0.52 (-0.1; -0.06)

EE – etynyloestradiol, CPA – octan cyproteronu, DRSP – drospirenon, 6 m – sześciu miesiącach, 95% CI – 95% przedział ufności, TCh – cholesterol całkowity, HDL-Ch – cholesterol frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości, LDL-Ch – cholesterol frakcji lipoprotein o niskiej gęstości, TG – triglicerydy, TG/HDL-Ch – stosunek stężenia triglicerydów do cholesterolu frakcji HDL w surowicy; HOMA-IR - poziom insuliny na czczo (µU/mL) x poziom glukozy na czczo (mmol/L) / 22.5; QUICKI – 1 / [log (poziom insuliny na czczo (µU/mL) + log (poziom glukozy na czczo (mg/dL))], FGIR –poziom glukozy na czczo (mg/dl) / poziom insuliny na czczo (µU/Ml)
 * różnica znamienista statystycznie w stosunku do wartości przed włączeniem leku (p<0.05)

Kolejnym krokiem była ocena czy zaobserwowany wzrost insulinooporności (spadek insulino-wrażliwości) w obydwu grupach kobiet przyjmujących doustną antykoncepcję miał związek ze zmianami w zawartości tkanki tłuszczowej, które stwierdzono w grupie przyjmującej preparat EE+DRSP oraz poziomie androgenów, które zaobserwowano w obydwu grupach. W wyniku przeprowadzonej analizy nie wykazano, aby zmiany w poziomie insulinemii, wskaźników HOMA-IR, QUICKI i FGIR w grupie przyjmującej preparat EE+DRSP korelowały z obserwowanymi zmianami w zawartości tkanki tłuszczowej (Tabela 7) oraz wskaźnikami androgenemii i surowiczego stężenia SHBG w obydwu grupach. Niemniej jednak w grupie przyjmującej preparat EE+DRSP zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy spadkiem wartości wskaźnika FGIR a wzrostem surowiczego stężenia SHBG ($R=0.716$, $p=0.02$) i spadkiem stężenia TST ($R=0.616$, $p=0.058$).

Wyniki przedstawiono w Tabeli 7 oraz Tabeli 8.

Tabela 7. Korelacje pomiędzy insulinemią, wskaźnikami insulinooporności/insulino-wrażliwości a zmianą w zawartości tkanki tłuszczowej oraz badanymi wskaźnikami androgenemii w grupie pacjentek przyjmujących preparat EE+DRSP. W tabeli przedstawiono współczynnik korelacji R oraz wartości p.

	delta TST	delta ANDROST	delta SHBG	delta FAI	delta FAT kg
delta INS	-,0414	-,3641	,0216	,1289	-,5483
	p=,888	p=,201	p=,942	p=,660	p=,159
delta HOMA-IR	-,1957	-,6277	-,1033	,1825	-,2393
	p=,588	p=,052	p=,776	p=,614	p=,605
delta QUICKI	,6187	,2541	,5741	,0528	,3341
	p=,057	p=,479	p=,083	p=,885	p=,464
delta FGIR	,6163	-,0249	,7163	,0976	,2310
	p=,058	p=,946	p=,020	p=,789	p=,618

Tabela 8. Korelacje pomiędzy insulinemią, wskaźnikami insulinooporności/insulino-wrażliwości a badanymi wskaźnikami androgenemii w grupie pacjentek przyjmujących preparat EE+CPA. W tabeli przedstawiono współczynnik korelacji R oraz wartości p.

	delta TST	delta ANDROST	delta SHBG	delta FAI
delta INS	,1217	,1696	-,0804	-,0434
	p=,630	p=,501	p=,759	p=,864
delta HOMA-IR	,0684	,2198	-,0040	-,1400
	p=,794	p=,397	p=,988	p=,592
delta QUICKI	-,0786	-,1001	,0395	-,0772
	p=,764	p=,702	p=,885	p=,768
delta FGIR	-,0630	-,0801	,0427	-,1305
	p=,810	p=,760	p=,875	p=,617

4.2.5 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane wskaźniki stanu zapalnego

Po 6 miesiącach zarówno w grupie EE+CPA jak i EE+DRSP zaobserwowano znamieny statystycznie wzrost stężenia CRP w surowicy. Nie wykazano jednak, aby rodzaj stosowanego preparatu miał przewagę i w większym stopniu wpływał na wzrost stężenia CRP. Ponadto w grupie EE+DRSP doszło do znamienego wzrostu stężenia fibrynogenu w surowicy. Obserwowany wzrost stężenia fibrynogenu w trakcie terapii preparatem EE+DRSP był znamienie wyższy niż w grupie EE+CPA. Wyniki dotyczące wybranych wskaźników stanu zapalnego przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane wskaźniki stanu zapalnego.

Zmienna	35 µg EE + 2 mg CPA (n=18)			20 µg EE + 3 mg DRSP (n= 15)		
	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)
CRP (mg/l)	0.88 ± 0.69	2.91 ± 2.89 *	1.84 (0.43; 3.26)	1.01±0.69	3.38± 2.66 *	2.34 (1.13; 3.55)
Fibrynogen (g/l)	2.84± 0.45	2.96± 0.62	0.12 (-0.22; 0.46)	2.83±0.63	3.92± 1.50 *	1.08 ** (0.23; 1.94)

EE – etynyloestradiol, CPA – octan cyproteronu, DRSP – drospirenon, 6 m – sześciu miesiącach, 95% CI – 95% przedział ufności, CRP – białko C-reaktywne
 * różnica znamienne statystycznie w stosunku do wartości przed włączeniem leku (p<0.05)
 ** znamienne różnica pomiędzy dwoma zastosowanymi DŚA (p<0.05)

W wyniku przeprowadzenia dalszych analiz wykazano, że obserwowany wzrost stężenia CRP w surowicy w grupie EE+CPA korelował ze wzrostem zawartości tkanki tłuszczowej (R=0.64, p=0.02), BMI (R=0.67, p=0.15) i masy ciała (R=0.72, p=0.008). Nie zaobserwowano natomiast takiej zależności w grupie kobiet leczonych preparatem EE+DRSP. Wyniki przedstawiono w Tabeli 10 oraz Tabeli 11.

Tabela 10. Korelacje pomiędzy wybranymi wskaźnikami stanu zapalnego oraz cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy i zaburzeń metabolicznych a parametrami antropometrycznymi w grupie pacjentek przyjmujących preparat EE+CPA. W tabeli przedstawiono współczynniki korelacji R oraz wartości p.

	delta CRP	delta fibrynogen	delta chemeryna	delta MCP-1	delta VCAM	delta IL-10
delta FAT kg	,6397	,2501	-,3378	-,5063	-,4627	-,0791
	p=,025	p=,433	p=,283	p=,093	p=,130	p=,807
delta BMI	,6799	,5169	-,2615	-,2862	-,1723	-,1579
	p=,015	p=,085	p=,412	p=,367	p=,592	p=,624
delta waga	,7213	,4878	-,3134	-,3238	-,2202	-,1394
	p=,008	p=,108	p=,321	p=,305	p=,492	p=,666
delta FFM	-,2706	,1211	,2235	,4739	,5279	-,0425
	p=,395	p=,708	p=,485	p=,120	p=,078	p=,896
delta TBW%	-,6390	-,2740	,3929	,3559	,4503	,0724
	p=,025	p=,389	p=,206	p=,256	p=,142	p=,823

Tabela 11. Korelacje pomiędzy wybranymi wskaźnikami stanu zapalnego oraz cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy i zaburzeń metabolicznych a parametrami antropometrycznymi w grupie pacjentek przyjmujących preparat EE+DSRP. W tabeli przedstawiono współczynniki korelacji R oraz wartości p.

	delta CRP	delta fibrynogen	delta chemeryna	delta MCP-1	delta VCAM	delta IL-10
delta FAT kg	-,3936	,0799	,4567	-,0283	,1845	,6419
	p=,335	p=,851	p=,255	p=,947	p=,662	p=,086
delta BMI	-,1370	,2768	,3843	-,0535	-,1685	,5287
	p=,746	p=,507	p=,347	p=,900	p=,690	p=,178
delta waga	-,1090	,3341	,4379	-,1453	-,1901	,5059
	p=,797	p=,419	p=,278	p=,731	p=,652	p=,201
delta FFM	,2797	,4746	,2268	-,2203	-,5403	,1197
	p=,502	p=,235	p=,589	p=,600	p=,167	p=,778
delta TBW%	,5919	-,0187	-,1777	-,0626	-,2712	-,4786
	p=,122	p=,965	p=,674	p=,883	p=,516	p=,230

4.2.6 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane wskaźniki dysfunkcji śródbłonna (PWV)

U pacjentek z PCOS stosowanie zarówno preparatu EE+CPA jak i EE+DRSP przez okres 6 miesięcy nie miało wpływu na wartość PWV. Wyniki przedstawiono w Tabeli 12.

Tabela 12. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na wartość PWV.

	35 µg EE + 2 mg CPA (n=18)			20 µg EE + 3 mg DRSP (n=15)		
	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)
PWV (m/s)	0.85 ± 0.04	0.87 ± 0.05	0.28 (- 0.12; 0.7)	0.83 ± 0.06	0.84 ± 0.05	0.08 (- 0.25; 0.42)
EE – etynyloestradiol, CPA – octan cyproteronu, DRSP – drospirenon, 6 m – sześciu miesiącach, 95% CI – 95% przedział ufności, PWV – prędkość przepływu fali tętna * różnica znamienista statystycznie w stosunku do wartości przed włączeniem leku (p<0.05)						

4.2.7 Ocena wpływu terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane surowicze stężenia cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy i zaburzeń metabolicznych.

Oba preparaty doustnej antykoncepcji spowodowały obniżenie stężenia MCP-1 w surowicy po okresie 6 miesięcy, ale jedynie w grupie EE+DRSP uzyskane różnice były istotne statystycznie ($p=0,04$). W grupie EE+CPA zaobserwowano spadek surowiczego stężenia sVCAM-1 jakkolwiek różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0,09$). W grupie EE+DRSP spadek surowiczych stężeń sVCAM-1 był na granicy istotności statystycznej ($p=0,05$). Analiza zbiorcza dwóch grup jednocześnie wykazała jednak, że stosowanie tych preparatów doustnej antykoncepcji przez okres 6 miesięcy istotnie obniża surowicze stężenia sVCAM-1 ($p=0,01$). Nie zaobserwowano natomiast żadnego wpływu stosowania tych dwóch DŚA na surowicze stężenia IL-10. W grupie EE+DRSP doszło do istotnego wzrostu stężenia chemeryny w surowicy. Wyniki dotyczące surowiczych stężeń cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy i zaburzeń metabolicznych przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 13. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane surowicze stężenia cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy i zaburzeń metabolicznych.

Zmienna	35 µg EE + 2 mg CPA (n=18)			20 µg EE + 3 mg DRSP (n= 15)		
	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)	Przed	Po 6 m	Różnica (95%CI)
MCP-1 (pg/ml)	275.2 ± 78.5	256.7 ± 90.7	- 70.42 (- 137.7; -3.1)	299.7± 89.0	268.4±72.0*	- 102.3 (- 161.9; -42.62)
sVCAM-1 (µg/ml)	921 ± 290	837 ± 220	- 84 (- 185; 16)	885 ± 382	727 ± 229*	- 158 (- 321; 4)
IL-10 (pg/ml)	4.07 ± 2.23	3.84 ± 2.12	- 0.73 (- 2.0; 0.52)	4.19±2.16	4.53 ± 1.96	- 1.06 (- 2.95; 0.83)
chemeryna (ng/ml)	114 ± 45	122 ± 39	- 6.14 (- 34.2; 21.8)	102 ± 37	129 ± 26 *	- 4.31 (- 31; 22.3)
EE – etynyloestradiol, CPA – octan cyproteronu, DRSP – drospirenon, 6 m – sześciu miesiącach, 95% CI – 95% przedział ufności, MCP-1 – białko chemotaktyczne dla monocytów; sVCAM-1 – rozpuszczalna forma cząsteczki adhezyjnej komórek śródbłonna, IL-10 – interleukina 10 * różnica istotna statystycznie w stosunku do wartości przed włączeniem leku ($p<0.05$)						

5. DYSKUSJA

Tradycyjną i najczęstszą metodą farmakoterapii u kobiet z PCOS nie planujących macierzyństwa jest stosowanie DŚA, które regulują krwawienia miesięczkowe i zmniejszają objawy hiperandrogenemii. Jednocześnie od dawna wiadomo, że DŚA zwiększają ryzyko powikłań zakrzepowo-zatorowych i mogą powodować wzrost wartości ciśnienia tętniczego. Ponadto w ostatnich latach zaczęto zwracać uwagę na potencjalne niekorzystne efekty metaboliczne stosowania syntetycznych estrogenów jak i gestagenów zawartych w DŚA. Nie ma pewności, że stosowanie hormonalnej antykoncepcji u kobiet z PCOS nie nasili istniejących już zaburzeń metabolicznych (w tym upośledzonej wyjściowo insulinowrażliwości oraz aterogennej dyslipidemii) prowadząc do wzrostu ryzyka rozwoju T2DM, NT i ChNS (Kuligowska-Jakubowska i wsp., 2012). Wobec tego celem mojej pracy była ocena wpływu stosowania DŚA na wybrane czynniki ryzyka rozwoju ChUSN u kobiet z PCOS. W badaniu porównałam wpływ 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi preparatami antykoncepcyjnymi zawierającymi dwa różne gestageny o właściwościach antyandrogennych – CPA oraz DRSP. Ponadto preparaty te różniły się dawką EE. Preparat EE+CPA zawierał 35 µg EE natomiast preparat EE+DRSP zawierał 20 µg EE. Poza wpływem na masę i skład ciała oraz profil hormonalny i metaboliczny badanych kobiet dokonałam także oceny wpływu na wybrane wskaźniki dysfunkcji śródbłónka takie jak PWV oraz surowicze stężenia cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy (VCAM-1, MCP-1, IL-10) i zaburzeń metabolicznych (chemeryna).

Główną obawą kobiet przed stosowaniem DŚA jest wzrost masy ciała. Najczęściej jest on spowodowany retencją płynów przez syntetyczny EE. Niemniej jednak u kobiet z PCOS przyczyną wzrostu masy ciała podczas stosowania DŚA może być ich bezpośredni wpływ na istniejącą już insulinoporność. Wyniki niektórych badań zdają się potwierdzać tą tezę. Vrbikova i wsp. (2006) wykazali, że u kobiet z PCOS przyjmujących preparat EE+CPA doszło do istotnego wzrostu masy ciała. W niniejszej pracy nie wykazałam aby 6 miesięczna terapia tym preparatem u kobiet z PCOS miała wpływ na BMI, obwód talii oraz skład ciała. Być może wynika to z faktu, że wyjściowy średni BMI pacjentek, które brały udział w niniejszym badaniu

był zdecydowanie niższy w porównaniu do BMI kobiet z przytoczonego przeze mnie badania.

W grupie kobiet przyjmującej EE+DRSP doszło natomiast do znaczącego wzrostu masy całkowitej tkanki tłuszczowej. Wzrost ten korespondował z całkowitym wzrostem masy ciała, który także się zwiększył, lecz różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej ($p=0.08$). Ponadto w grupie kobiet stosujących preparat EE+DRSP zaobserwowałam znaczący spadek procentowej zawartości wody w organizmie co potwierdza natriuretyczne działanie DRSP. Procentowa analiza zmian w poszczególnych parametrach składu ciała również wykazała, że kobiety z PCOS przyjmujące preparat EE+DRSP po 6 miesiącach miały średnio o 2.5 % większe BMI ($p=0.05$) oraz 2.3 % większą masę ciała ($p=0.06$) w stosunku do wartości wyjściowych. Podobne wyniki uzyskali Aydin i wsp. (2013), którzy po 6 miesiącach terapii DŚA zawierającym EE+DRSP zaobserwowali istotny wzrost zawartości tkanki tłuszczowej pomimo że masa ciała, BMI i obwód talii pozostały niezmienione (Aydin i wsp., 2013). Wyniki metaanalizy przeprowadzonej przez Gallo i wsp. (2004) wskazują, iż wpływ stosowania DŚA na zwiększenie masy ciała i dystrybucję tkanki tłuszczowej nie jest znaczący, ale konieczne są dalsze badania poruszające to zagadnienie zwłaszcza u kobiet z PCOS (Gallo i wsp., 2008).

Jak już wspomniałam jednym z podstawowych wskazań do terapii DŚA u kobiet z PCOS jest zmniejszenie istniejącej hiperandrogenemii. Badając wpływ stosowanych przeze mnie preparatów doustnej antykoncepcji na profil hormonalny tej grupy kobiet, podobnie jak inni autorzy wykazałam, że zarówno stosowanie EE+CPA jak i EE+DRSP prowadzi do znaczącego spadku stężenia testosteronu całkowitego oraz androstendionu. Ponadto obydwa preparaty znacząco podwyższały surowicze stężenia SHBG co wraz ze spadkiem surowiczych stężeń testosteronu w konsekwencji doprowadziło do znaczącego spadku FAI. Redukcja stężenia androgenów podczas stosowania DŚA spowodowana jest antygonadotropowym (spadek sekrecji LH) działaniem EE oraz składowej gestagennej. Ponadto EE podany drogą doustną pobudza wątrobową produkcję SHBG. Działanie to obserwowane jest praktycznie we wszystkich badaniach oceniających wpływ stosowania DŚA na surowicze stężenie gonadotropin oraz hormonów jajnikowych (De Leo i wsp., 2010; Mes-Krowinkel i wsp., 2014). Właściwości antyandrogenne DŚA zależą również od rodzaju składowej gestagennej. CPA poza blokowaniem receptorów dla androgenów hamuje

także obwodową konwersję testosteronu do dihydrotestosteronu, który wykazuje wielokrotnie większe działanie androgenne w porównaniu do TST (Nader i Diamanti-Kandarakis, 2007).

Nadciśnienie tętnicze jest niepodważalnym czynnikiem ryzyka rozwoju ChUSN. Dotychczasowe badania epidemiologiczne sugerują zwiększony odsetek występowania NT u kobiet z PCOS, zwłaszcza tendencję do podwyższonych wartości SBP, większą zmienność BP w ciągu dnia oraz brak fizjologicznej redukcji wartości BP w ciągu nocy. Jednak czynnikiem ograniczającym interpretację tych badań jest zwiększona częstość występowania otyłości wśród kobiet z PCOS, która niezależnie stanowi znaczący czynnik ryzyka rozwoju NT. Wynikająca z insulinooporności kompensacyjna hiperinsulinemia, wzmożona aktywacja układu współczulnego i hiperandrogenemia to pozostałe czynniki odpowiedzialne za rozwój NT w tej grupie kobiet. Ponadto powszechnie stosowane DŚA zawierające EE poprzez wzmożoną syntezę angiotensynogenu w wątrobie i aktywację układu renina-angiotensyna-aldosteron mogą także prowadzić do wzrostu wartości BP. W mojej pracy również oceniałam wpływ 6 miesięcznej terapii DŚA na wartości BP i HR u badanych kobiet z PCOS. W grupie EE+CPA zaobserwowałam znamienne wzrost dobowych wartości ciśnienia tętniczego zarówno skurczowego jak i rozkurczowego oraz przyspieszenie akcji serca w ciągu doby. Nie odnotowałam natomiast znamiennych różnic w wysokości SBP w ciągu dnia i HR w godzinach nocnych. W grupie EE+DRSP nie stwierdziłam natomiast wpływu na dobowe wartości BP i HR. Kolejnym krokiem była próba odpowiedzi na pytanie który z czynników humoralnych mógł mieć wpływ na obserwowane zmiany w średnich wartościach ciśnienia dobowego w grupie EE+CPA. W tym celu dokonałam analizy korelacji zmian ciśnienia tętniczego w ciągu całej doby oraz osobno w ciągu dnia i nocy z obserwowanymi zmianami w poziomie insulinemii, wskaźników insulinooporności/insulinowrażliwości oraz wskaźników androgenemii. W wyniku przeprowadzonej analizy wykazałam znamienne statystycznie ujemną korelację pomiędzy wzrostem SBP w ciągu dnia a wskaźnikami insulinowrażliwości QUICKI ($r = -0.86$, $p = 0.013$) i FGIR ($r = -0.90$, $p = 0.006$). Ponadto wykazałam znamienne statystycznie dodatnią korelację pomiędzy wzrostem SBP w nocy a zmniejszeniem się stężenia TST w surowicy w grupie EE+CPA ($R=0.76$, $p=0.046$). Nie stwierdziłam natomiast aby obserwowany podczas terapii preparatem EE+CPA wzrost akcji serca korelował z którymkolwiek badanym

parametrem humoralnym. Także wyniki badań innych autorów wskazują, że stosowanie u kobiet z PCOS preparatów EE+CPA powoduje znamieny wzrost SBP, DBP oraz średnich wartości BP w ciągu dnia (Luque-Ramirez i wsp., 2009a). W przeciwieństwie do wyników mojej pracy autorzy ci nie zanotowali natomiast zmian w poziomie SBP, DBP i średnich wartości BP w godzinach nocnych. Natomiast w podgrupie pacjentek z PCOS leczonych metforminą uzyskano redukcję SBP, DBP i średniego BP w ciągu dnia, co potwierdza znaczenie insulinooporności w patogenezie NT u kobiet z PCOS. Niektórzy badacze nie odnotowali jednak aby DŚA zawierające EE+CPA prowadziły do znamienego wzrostu BP (Meyer i wsp., 2007). W przytoczonym badaniu w badanej grupie kobiet z PCOS i towarzyszącą nadwagą lub otyłością stwierdzono stabilne wartości BP w czasie terapii preparatem zawierającym EE+CPA, pomimo obserwowanego zwiększenia sztywności naczyń tętniczych (wzrost wartości PWV), który korelował ze wzrostem insulinooporności w tej grupie pacjentek. Również dawka EE zawartego w stosowanych preparatach (35 µg EE versus 20 µg) nie miała wpływu na poziom BP. Wyniki moich badań dotyczące pacjentek przyjmujących preparat EE+DRSP potwierdzają doniesienia innych autorów, którzy również nie stwierdzili, aby lek ten wpływał na dobowe wartości BP u pacjentek z PCOS (Fruzzetti i wsp., 2010; Guido i wsp., 2004). Podobne badania przeprowadzili w ostatnim czasie badacze brazylijscy w grupie kobiet zdrowych, którzy także nie odnotowali zmian w dobowych wartościach BP po 6 miesiącach terapii preparatem EE+DRSP (Giribela i wsp., 2015). Wynika to zapewne z faktu, iż DRSP będący syntetycznym progestagenem o właściwościach antymineralokortykosteroidowych wywiera działanie natriuretyczne i zapobiega retencji płynów w organizmie powodowanej przez syntetyczny EE.

Kolejnym krokiem moich analiz była ocena wpływu zastosowanych w badaniu DŚA na profil lipidowy oraz gospodarkę węglowodanową kobiet z PCOS. Dyslipidemia aterogenna jest najbardziej powszechnym zaburzeniem metabolicznym w PCOS charakteryzującym się obniżonym stężeniem frakcji HDL-Ch, podwyższonym stężeniem TG i obecnością małych, gęstych cząsteczek LDL-Ch. Wyjściowo wśród badanych przeze mnie pacjentek poziom TG przekraczający 150 mg/dl stwierdziłam u 9.5 % kobiet (n=4) a obniżony poziom frakcji HDL-Ch u 19 % kobiet (n=8). Wpływ DŚA na profil lipidowy był przedmiotem wielu badań. Powszechnie znany jest fakt zwiększenia surowiczych stężeń TG i frakcji HDL-Ch podczas stosowania

DŚA w których EE był podawany drogą doustną (Sitruk-Ware i Nath, 2013). Podobne wyniki wykazała metaanaliza przeprowadzona przez Halperin i wsp (2011) u kobiet z PCOS stosujących doustną antykoncepcję. Przeprowadzone przeze mnie badania również potwierdziły powyższe obserwacje. Po 6 miesiącach stosowania EE+CPA jak i EE+DRSP doszło do znamiennego wzrostu stężenia TG w surowicy w obydwu grupach pacjentek. Ponadto u pacjentek przyjmujących EE+CPA zaobserwowałam znamienny wzrost stężenia TCh w surowicy oraz stężenia frakcji HDL-Ch. Różnica ta była jednak na granicy znamienności statystycznej ($p=0.05$). Natomiast w grupie kobiet stosujących preparat EE+DRSP nie zaobserwowałam wzrostu surowiczych stężeń frakcji HDL-Ch ($p=0.79$). Podobne wyniki otrzymali również inni badacze oceniający wpływ stosowania DŚA zawierających EE+CPA na profil lipidowy kobiet z PCOS (Gode i wsp., 2011; Luque-Ramirez i wsp., 2007a; Rautio i wsp., 2005). Natomiast Romualdi i wsp. (2013) badali wpływ preparatów doustnej antykoncepcji zawierających DRSP w połączeniu z różnymi dawkami EE (20 μ g lub 30 μ g) stwierdzając wzrost stężenia TCh, frakcji LDL-Ch i HDL-Ch oraz TG w surowicy u wszystkich badanych kobiet z PCOS. Jednakże wyższe stężenia TG odnotowano w grupie pacjentek leczonych preparatem zawierającym 30 μ g EE, co potwierdza, że efekt ten jest przede wszystkim zależny od doustnie przyjętej dawki EE. Jednocześnie niektóre przeprowadzone wśród kobiet z PCOS badania z ostatnich lat sugerują, iż terapia EE+CPA nie ma znamiennego wpływu na profil metaboliczny w tym stężenia lipidów w surowicy (Karabulut i wsp., 2012). Podobne obserwacje dotyczyły DŚA zawierających EE+DRSP (Fruzzetti i wsp, 2010).

W kolejnym etapie mojej pracy poddałam ocenie wpływ stosowania DŚA na gospodarkę węglowodanową oraz wskaźniki insulinooporności/wrażliwości. Stwierdziłam, że wśród pacjentek stosujących EE+CPA doszło do znamiennego wzrostu surowiczych stężeń insuliny, podczas gdy w grupie kobiet stosujących EE+DRSP zmiana ta nie była istotna statystycznie ($p=0.40$). Niemniej jednak w obydwu grupach stwierdziłam znamienne różnice w wartościach wszystkich trzech wskaźników insulinooporności/insulinowrażliwości. Zaobserwowałam znamienny wzrost wartości wskaźnika HOMA-IR oraz stosunku surowiczych stężeń TG/HDL-Ch zarówno w grupie EE+CPA jak i EE+DRSP oraz znamienny spadek wartości wskaźników QUICKI oraz FGIR. Obserwowane zmiany były porównywalne w obydwu grupach pacjentek i nie zależały od rodzaju stosowanego preparatu DŚA.

Wyniki dotychczasowych badań nad wpływem DŚA na gospodarkę węglowodanową u kobiet z PCOS są bardzo rozbieżne. W większości nie zaobserwowano, aby taka terapia wiązała się z pogorszeniem tolerancji glukozy, chociaż ocenę przeprowadzano w grupach różniących się wiekiem, parametrami antropometrycznymi, pochodzeniem etnicznym, wywiadem rodzinnego występowania cukrzycy i rodzajem stosowanego preparatu doustnej antykoncepcji (Vrbikova i Cibula, 2005). Niejasna jest również ocena wpływu DŚA na insulinooporność u kobiet z PCOS w której oprócz jej nasilenia, obserwowano brak zmian lub nawet zwiększenie insulinooporności. Nie bez znaczenia jest dawka EE zastosowanego w DŚA jak i rodzaj składowej gestagennej. CPA jest najbardziej popularną składową gestageną stosowaną u kobiet z hiperandrogenizmem, który w mniejszym stopniu niż pochodne 19-nortestosteronu wpływa na gospodarkę węglowodanową. W przeciwieństwie do uzyskanych przeze mnie w niniejszej pracy wyników, wcześniejsze badania dotyczące terapii DŚA zawierającymi EE+CPA nie potwierdziły, aby insulinooporność oceniana za pomocą wskaźników HOMA-IR i QUICKI uległa zmianie (Dardzińska i wsp., 2014). Być może przyczyną jest mała czułość tych metod przy weryfikacji niewielkich zmian w insulinooporności. Natomiast Meyer i wsp. (2007) w grupie otyłych kobiet z PCOS leczonych przez 6 miesięcy tym samym DŚA stwierdzili zwiększenie IR. Powyższe wnioski wysunęli na podstawie zaobserwowanego przyrostu pola pod krzywą insulinową w czasie doustnego testu tolerancji glukozy, pomimo że wskaźniki HOMA-IR, QUICKI oraz BMI a także WHR nie uległy zmianie. Podobny niekorzystny wpływ na gospodarkę węglowodanową badacze ci opisali również w późniejszych pracach Teede i wsp. (2010). Należy podkreślić, że obydwa przytoczone badania dotyczyły kobiet z PCOS i towarzyszącą nadwagą lub otyłością. Natomiast wyniki innych autorów sugerują brak wpływu preparatu zawierającego EE+CPA na profil metaboliczny i insulinooporność pomimo uzyskanej redukcji podskórnej tkanki tłuszczowej (Karabulut i wsp, 2012). W przeciwieństwie do moich obserwacji zastosowanie przez innych badaczy preparatów DŚA zawierających DRSP posiadający właściwości antymineralokortykosteroidowe w połączeniu z 20 µg lub 30 µg EE zdaje się zmniejszać insulinooporność (Fruzzetti i wsp, 2010) bądź nie wywierać wpływu na wydzielanie insuliny i obwodową wrażliwość na insulinę (Guido i wsp, 2004).

Kolejnym krokiem moich badań była ocena czy zaobserwowany wzrost insulinooporności (spadek insulinooporności) w obydwu grupach kobiet

przyjmujących doustną antykoncepcję miał związek ze zmianami w zawartości tkanki tłuszczowej, które stwierdziłam w grupie EE+DRSP oraz stężeniu wskaźników androgenemii, które zaobserwowałam w obydwu grupach pacjentek. W wyniku przeprowadzonej analizy nie wykazałam, aby zmiany w poziomie insulinemii, wskaźników HOMA-IR, QUICKI i FGIR w grupie EE+DRSP korelowały z obserwowanymi zmianami w zawartości tkanki tłuszczowej oraz wskaźnikami androgenemii i surowiczego stężenia SHBG w obydwu grupach. Niemniej jednak w grupie EE+DRSP zaobserwowałam dodatnią korelację pomiędzy spadkiem wartości wskaźnika FGIR a wzrostem surowiczego stężenia SHBG ($R=0.716$, $p=0.02$) i spadkiem stężenia TST ($R=0.616$, $p=0.058$).

Na podstawie uzyskanych przeze mnie i innych badaczy wyników można przypuszczać, że wpływ DŚA na insulinowrażliwość i tolerancję glukozy nie musi być jednakowy u wszystkich kobiet z PCOS. Możliwe jest, że terapia tymi preparatami jest obojętna metabolicznie u kobiet z prawidłowym BMI lub nawet poprawia wrażliwość na insulinę poprzez obniżenie stężenia wolnych androgenów. Natomiast kobiety otyłe, z rodzinnym wywiadem cukrzycy lub stwierdzoną cukrzycą ciążową mają większe ryzyko ujawnienia się zaburzeń gospodarki węglowodanowej w trakcie stosowania DŚA. Skuteczne leczenie hiperandrogenizmu z przeciwdziałaniem zaburzeniom metabolicznym można realizować poprzez terapię skojarzoną polegającą na równoczesnym przyjmowaniu DŚA z lekiem uwrażliwiającym na insulinę, jednak korzyści stosowania takiego połączenia wymagają dalszych badań (Jing i wsp., 2008). Podsumowując u kobiet z PCOS zaleca się stosowanie DŚA zawierających niskie dawki EE ($<30 \mu\text{g}$), ale nie wiadomo, czy dawki rzędu 20 lub $15 \mu\text{g}$ przynoszą dodatkowy korzystny wpływ na metabolizm węglowodanów i nie zwiększają ryzyka rozwoju T2DM. Dotychczas nie określono który z syntetycznych gestagenów w najmniejszym stopniu wpływa na gospodarkę węglowodanową.

U kobiet z PCOS zwłaszcza z towarzyszącą otyłością typu brzuszego, insulinopornością i kompensacyjną hiperinsulinemią stwierdza się obecność przewlekłego stanu zapalnego o niewielkim nasileniu z często współistniejącą dysfunkcją śródbłónka (Gonzalez, 2012). Wobec tego kolejnym etapem moich badań była ocena wpływu DŚA na wybrane wskaźniki stanu zapalnego, dysfunkcji śródbłónka i surowicze stężenia cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy i ChUSN. Jednym z najbardziej znanych wskaźników procesu zapalnego jest CRP.

Jego związek z uszkodzeniem funkcji śródbłónka i wydzielaniem MCP-1 sprawia, iż coraz częściej postrzegane jest jako czynnik proaterogeny (Bisoendial i wsp, 2010; Hansson, 2005). Podwyższone stężenia CRP zaobserwowano również u kobiet z PCOS (Escobar-Morreale i wsp, 2011; Samy i wsp, 2009). W moich badaniach po 6 miesiącach leczenia zarówno w grupie EE+CPA jak i EE+DRSP zaobserwowałam znamienne statystycznie wzrost stężenia CRP w surowicy. Ponadto w grupie EE+CPA obserwowany wzrost surowiczych stężeń CRP korelował ze wzrostem zawartości tkanki tłuszczowej, BMI i masy ciała co mogłoby sugerować jego związek ze zmianami aktywności sekrecyjnej tkanki tłuszczowej. W grupie EE+DRSP nie zaobserwowałam, aby wzrost surowiczych stężeń CRP był połączony z istotnymi zmianami BMI i składu ciała. W dalszych moich obserwacjach nie odnotowałam także, aby zwiększeniu stężenia CRP towarzyszył wzrost MCP-1 oraz sVCAM-1 (wskaźnika dysfunkcji śródbłónka). Może to sugerować iż wzrost surowiczego stężenia CRP jest efektem bezpośredniego działania doustnego EE na komórki wątrobowe. Także 4 miesięczna terapia DŚA zawierającym EE+CPA prowadzi do wyraźnego wzrostu stężenia CRP w surowicy, ale nie powoduje zwiększenia BMI, obwodu talii czy surowiczych stężeń IL-6 (Dardzińska i wsp, 2014). Również wyniki badań innych autorów wskazują, iż stosowanie zarówno preparatu EE+CPA jak i EE+DRSP przez okres 6 miesięcy w podobnej do badanej przeze mnie populacji szczupłych kobiet z PCOS powoduje znamienne wzrost surowiczych stężeń CRP, który koreluje ze znamienym wzrostem wskaźnika BMI i HOMA-IR w obu badanych grupach (Christakou i wsp., 2014). Ponadto stwierdzono, że stężenie CRP i wskaźnik BMI zwiększył się w mniejszym stopniu w grupie leczonej EE+DRSP niż EE+CPA, co tłumaczono większą dawką EE w preparacie EE+CPA. Przeprowadzona przeze mnie analiza nie wykazała, aby rodzaj stosowanego preparatu miał przewagę i w większym stopniu wpływał na wzrost stężenia CRP.

Na zwiększone ryzyko ChUSN u kobiet z PCOS ma wpływ nie tylko istniejący stan prozapalny ale również zaburzenia funkcji układu krzepnięcia i fibrynolizy integralnie związane ze współistniejącą dysfunkcją śródbłónka i ściany naczyń. Podwyższony surowiczy poziom fibrynogenu poprzez wpływ na agregację płytek krwi może powodować zwiększenie ryzyka wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych. Ponadto dowiedziono, że obecność PCOS i towarzyszących mu zaburzeń zwiększa

ryzyko zakrzepowe 1.5 krotnie w porównaniu z grupą kobiet zdrowych a względne ryzyko ŻChZZ u kobiet z PCOS przyjmujących dwuskładnikowe DŚA jest 2 krotnie wyższe w porównaniu z kobietami zdrowymi także stosującymi doustną antykoncepcję (Bird i wsp., 2013). W powyższej analizie znamienne większą liczbę przypadków zakrzepicy odnotowano u pacjentek z PCOS zażywających DŚA w porównaniu z pacjentkami nie stosującymi tych preparatów (23.7/10 000 osobołat versus 6.3/10 000 osobołat).

Jednocześnie oczywistym jest, że na ryzyko ŻChZZ wpływa nie tylko dawka EE ale także rodzaj składowej gestagennej zawartej w dwuskładnikowych DŚA. Duża metaanaliza przeprowadzona przez Lidegaard i wsp. (2011) wykazała, iż gestageny III generacji (dezogestrel i gestoden) oraz IV generacji (DRSP) zwiększają ryzyko zakrzepicy żył głębokich w większym stopniu w porównaniu do gestagenów II generacji (levonorgestrel). Dodatkowo ryzyko to u kobiet stosujących DŚA zawierające 20 µg EE+DRSP jak i 30 µg EE+DRSP było podobne. Na podstawie tej metaanalizy można domniemać, że nie dawka EE rzędu 20 µg lub 35 µg, ale przede wszystkim składowa gestagenna odpowiada za ryzyko ŻChZZ. W znaczącej większości badań oceniających preparaty z DRSP w porównaniu z preparatami zawierającymi levonorgestrel stwierdzono, że ryzyko ŻChZZ było wyższe dla DRSP (Wu i wsp., 2013), aczkolwiek niektóre doniesienia nie potwierdzają tej hipotezy (Dinger i wsp., 2007).

Również wyniki dotychczasowych badań oceniających stężenie fibrynogenu w surowicy u kobiet z PCOS są sprzeczne. W większości z nich nie obserwowano różnicy pomiędzy surowiczym stężeniem fibrynogenu u kobiet zdrowych i z zaburzeniami hormonalnymi (Karakurt i wsp., 2008; Kebapcilar i wsp., 2009; Nasiek i wsp., 2007), ale w kilku odnotowano wyższe wartości u kobiet z PCOS (Erdogan i wsp., 2008; Manneras-Holm i wsp., 2011). Znany jest fakt, że zarówno palenie tytoniu jak i stosowanie DŚA może prowadzić do wzrostu surowiczych stężeń fibrynogenu. Moje badania wykazały, że do znamiennego wzrostu stężenia fibrynogenu doszło w grupie EE+DRSP. W dalszej analizie nie wykazałam jednak, aby wzrost stężenia tego parametru korelował ze wzrostem zawartości tkanki tłuszczowej, BMI i masy ciała obserwowanym w tej grupie pacjentek. Należy podkreślić, iż wzrost stężenia fibrynogenu w grupie EE+DRSP był znamienne wyższy niż w grupie EE+CPA. Podobne wyniki uzyskali badacze brazylijscy oceniający parametry krzepnięcia, w tym stężenie fibrynogenu w surowicy w trakcie

terapii DŚA różniącymi się dawką EE i rodzajem składowej gestagennej (DRSP lub levonorgestrel) (Stocco i wsp., 2015). Praca ta dotyczyła jednak kobiet bez towarzyszących zaburzeń hormonalnych. Natomiast wnioski dotyczące wpływu stosowania preparatów EE+CPA na poziom fibrynogenu w surowicy pacjentek z PCOS są różne. Niektórzy badacze nie odnotowali zmian (Karakurt i wsp., 2008), inni opisywali jego wzrost ponad wartości referencyjne nawet u szczupłych kobiet z PCOS po 6 miesiącach terapii (Luque-Ramirez i wsp., 2009b). Rozbieżności w wynikach badań nad markerami układu krzepnięcia i fibrynolizy u kobiet z PCOS wynikają najpewniej z małej liczebności badanych grup oraz braku grup kontrolnych dobranych pod względem wieku i masy ciała. Wobec małej zapadalności na ŻChZZ w populacji młodych kobiet prace oceniające bezpieczeństwo stosowania nowych preparatów DŚA pod kątem ryzyka wystąpienia ŻChZZ powinny dotyczyć odpowiednio dużych grup pacjentek i obejmować długi okres obserwacji tak, aby nie brakowało badań z klinicznymi punktami końcowymi.

Coraz częściej za niezależne wskaźniki ryzyka ChUSN uznawane są nowe nieinwazyjne metody oceny funkcji śródbłónka [ocena dylatacji tętnicy ramiennej indukowanej niedokrwieniem [(FMD, *flow-mediated dilation*), zmian strukturalnych ściany tętnicy poprzez ocenę kompleksu błona śródkowa-śródbłonek (IMT, *intima-media thickness*) oraz badanie podatności ścian naczyń tętniczych (pomiar PWV)]. Podkreśla się znaczenie rokownicze pomiaru PWV jako predyktora zdarzeń sercowo-naczyniowych w różnych populacjach pacjentów, jednakże badań dotyczących wpływu DŚA na wartość pomiaru PWV w populacji pacjentek z PCOS jest niewiele. Z tego względu w mojej pracy dokonałam również oceny wpływu badanych preparatów doustnej antykoncepcji na sztywność naczyń tętniczych. Nie wykazałam jednak aby stosowanie zarówno preparatu EE+CPA jak i EE+DRSP przez okres 6 miesięcy wpłynęło na wartość PWV. Podobne wyniki uzyskali Kaya i wsp. (2012), którzy również nie zaobserwowali znaczącego wpływu preparatu zawierającego EE+DRSP na PWV. Natomiast Meyer i wsp (2007) zaobserwowali 7 % wzrost PWV u pacjentek z PCOS leczonych 35 µg EE+CPA w porównaniu z grupą otrzymującą DŚA zawierającą 20 µg EE. Zwiększenie wartości PWV nie było związane ze wzrostem BP, które pozostało stabilne bez względu na formę terapii, ale korelowało ze wzrostem insulinooporności w grupie leczonej 35 µg EE+CPA. Obserwacja

ta może potwierdzać tezę iż większa sztywność naczyń tętniczych zależy od nasilenia IR, która z kolei zależy od dawki EE. Również poprzednie prace Meyer i wsp (2005) dowodzą, że kobiety z PCOS i towarzyszącą nadwagą charakteryzują się wyższymi wartościami PWV w porównaniu z odpowiednio dobraną pod względem BMI grupą kontrolną kobiet zdrowych. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt iż w przytoczonych pracach wszystkie badane kobiety miały nadwagę lub otyłość. W moim badaniu tylko 9.5 % pacjentek (n=4) było otyłych ($BMI > 30$) a 19 % (n=8) miało nadwagę ($BMI \geq 25$ i < 30). Ponadto wzrost wartości PWV koreluje z wiekiem a najbardziej dynamiczne zmiany w śródbłonku zachodzą po 4 dekadzie życia. Grupę badanych przeze mnie pacjentek z PCOS stanowiły młode kobiety poniżej 40 r.ż. (średnia wieku 25 lat). Powyższe czynniki najpewniej przyczyniły się do stabilnych wartości PWV przed i po leczeniu badanymi przeze mnie DŚA.

Dowodzono, iż pacjenci z zespołem metabolicznym oraz większym stopniem insulinooporności cechują się nie tylko wyższymi surowiczymi stężeniami CRP czy fibrynogenu, ale także surowiczych cząsteczek adhezyjnych (sVCAM-1, sICAM-1) biorących udział w patogenezie miażdżycy (Kressel i wsp, 2009). Ich poziom może odzwierciedlać stan dysfunkcji śródbłonka i być markerem choroby wieńcowej oraz T2DM również u kobiet z PCOS (Diamanti-Kandarakis i wsp., 2006b). Przeprowadzone w tej grupie pacjentek badania wskazują także na wyższe stężenia MCP-1 w surowicy w porównaniu z grupą kobiet zdrowych, co również może mieć znaczenie w procesie aterogenezy (Hu i wsp., 2011). W mojej pracy zaobserwowałam, iż obydwa badane preparaty doustnej antykoncepcji spowodowały obniżenie stężenia MCP-1 w surowicy po okresie 6 miesięcy, ale jedynie w grupie EE+DRSP uzyskane różnice były istotne statystycznie ($p=0,04$). W grupie EE+CPA zaobserwowałam spadek surowiczego stężenia sVCAM-1 jednak różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0.09$). W grupie EE+DRSP spadek surowiczych stężeń sVCAM-1 był natomiast na granicy istotności statystycznej ($p=0.05$). Analiza zbiorcza dwóch grup jednocześnie wykazała jednak, że stosowanie powyższych preparatów DŚA przez okres 6 miesięcy istotnie obniża surowicze stężenia sVCAM-1 ($p=0.01$). Efektu tego nie potwierdzili (Bilgir i wsp., 2009), którzy nie odnotowali znaczących zmian sVCAM-1 u kobiet z PCOS po 3 miesięcznej terapii preparatem EE+CPA. Jednocześnie podobne badania przeprowadzone w grupie pacjentek z PCOS z towarzyszącą nadwagą wykazały, iż redukcja masy ciała

przyczyniła się do częściowego obniżenia surowiczych stężeń sVCAM-1 u tych kobiet (Moran i wsp, 2012b; Thomson i wsp., 2012). Podobne efekty zaobserwowano u pacjentek po terapii metforminą lub jej skojarzeniu z DŚA (Bilgir i wsp, 2009; Diamanti-Kandarakis i wsp., 2006a). Rozbieżności w wynikach badań dotyczących stężenia cząsteczek adhezyjnych w surowicy pacjentek z PCOS potwierdzają badania Dardzińska i wsp (2014), w których po 4 miesięcznej terapii preparatem DŚA zawierającym EE+CPA lub metforminą nie odnotowano redukcji stężenia sVCAM-1 w surowicy. Najpewniej brak tego efektu był związany z prawidłową masą ciała badanych kobiet w przeciwieństwie do prac przytoczonych wcześniej i przeprowadzonych wśród pacjentek z nadwagą i otyłością. Jedyną badaną przeze mnie cytokiną przeciwzapalną była IL-10, której rola w odpowiedzi immunologicznej polega na ograniczeniu syntezy cytokin prozapalnych (m.in. TNF, IL-1, IL-6), co w konsekwencji hamuje proces zapalny w ścianie naczyń i może odgrywać rolę w stabilizacji blaszki miażdżycowej. Wśród badanych przeze mnie pacjentek z PCOS nie zaobserwowałam żadnego wpływu stosowania DŚA zawierających EE+CPA lub EE+DRSP na surowicze stężenia IL-10.

W swojej pracy nawiązałam również do stosunkowo niedawno odkrytej cytokiny o nazwie chemeryna oraz wpływu DŚA na jej surowicze poziomy u pacjentek z PCOS. Dotychczas przeprowadzone badania sugerują, iż chemeryna nie tylko moduluje odpowiedź immunologiczną, ale także bierze udział w patogenezie miażdżycy i być może jest mediatorem łączącym otyłość z innymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego oraz potencjalnym markerem ZM (Bozaoglu i wsp, 2007; Goralski i wsp, 2007). Sugeruje się, że podwyższone stężenia chemeryny mogą być czynnikiem ryzyka ChUSN zwłaszcza u pacjentów z ZM (Aksan i wsp., 2014; Dong i wsp, 2011). Jednak Lehrke i wsp (2009) nie wykazali aby surowicze stężenia chemeryny miały związek z nasileniem zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych ocenianych przy pomocy wskaźnika uwapnienia tych tętnic (CS, *calcium score*) oznaczanym w badaniu tomografii komputerowej. Wiele doniesień wskazuje na dodatnią korelację pomiędzy surowiczymi stężeniami chemeryny a poszczególnymi składowymi ZM jak BMI, stężeniem TG w surowicy, wartościami RR, przy jednoczesnym braku związku z IR (Bozaoglu i wsp, 2007; Chu i wsp., 2012). Jednakże zmiany stężenia chemeryny w surowicy są wykrywane w stanie przedcukrzycowym i znamienne wyższe u pacjentów z upośledzoną tolerancją

glukozy (Tonjes i wsp, 2010) co może wskazywać na rolę tej cytokiny w patogenezie dysfunkcji tkanki tłuszczowej, upośledzonego metabolizmu węglowodanów i IR. Badania przeprowadzone u kobiet z PCOS wykazały zwiększone stężenie chemeryny w surowicy w porównaniu z grupą kobiet zdrowych (Ademoglu i wsp., 2014; Yang i wsp., 2016). Podobne wyniki uzyskali badacze amerykańscy, którzy u kobiet z PCOS oprócz wyższych surowiczych stężeń chemeryny wykazali iż jej poziom korelował z BMI, ilością tkanki tłuszczowej trzewnej oraz wskaźnikiem HOMA-IR (Kort i wsp., 2015). Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, iż w grupie EE+DRSP doszło do znamiennego wzrostu stężenia chemeryny w surowicy. Osobiście nie wykazałam jednak, aby wzrost ten korespondował ze wzrostem masy tkanki tłuszczowej i całkowitym zwiększeniem masy ciała, które zaobserwowałam po 6 miesiącach terapii tym preparatem.

Reasumując, wyniki moich badań wskazują, że stosowanie preparatów DŚA u kobiet z PCOS ma wpływ na klasyczne czynniki ryzyka rozwoju ChUSN, wybrane wskaźniki dysfunkcji śródbłónka oraz stanu zapalnego, cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy oraz zaburzeń metabolicznych. Obydwa badane przeze mnie preparaty DŚA prowadzą do zmniejszenia hiperandrogenemii. Stosowanie preparatu zawierającego CPA pomimo, iż nie prowadzi do istotnego wzrostu masy ciała to powoduje znamienny wzrost surowiczych stężeń insuliny, TG, TCh oraz stężenia frakcji HDL-Ch. Wpływa także na wzrost dobowych wartości BP zarówno skurczowego jak i rozkurczowego oraz przyspieszenie HR w ciągu doby. Natomiast stosowanie preparatu zawierającego DRSP chociaż powoduje wzrost masy tkanki tłuszczowej to nie przyczynia się do znamiennych różnic w poziomie insulinemii i profilu lipidowym poza wzrostem stężenia TG w surowicy. Lek ten nie ma wpływu na dobowe wartości BP i HR najpewniej na skutek swojego działania natriuretycznego. Pomimo odmiennego wpływu obydwu badanych preparatów na parametry antropometryczne kobiet z PCOS obserwuje się ich niekorzystny efekt na IR, który odzwierciedla znamienny wzrost wartości wskaźnika HOMA-IR, stosunku surowiczych stężeń TG/HDL-Ch oraz spadek wartości wskaźników QUICKI i FGIR. Ponadto obydwa badane preparaty powodują wzrost stężenia CRP w surowicy. Stosowanie preparatu zawierającego EE+DRSP dodatkowo prowadzi do wzrostu stężenia fibrynogenu oraz chemeryny i spadku stężenia MCP-1

w surowicy. Żaden ze stosowanych preparatów nie miał istotnego wpływu na surowicze stężenia sVCAM-1 i IL-10. Także wartość PWV będąca wykładnikiem funkcji śródbłonna nie uległa zmianie w obydwu badanych grupach.

6. WNIOSKI

Wyniki przeprowadzonych i przedstawionych w niniejszej pracy badań pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

- Stosowanie EE+CPA przez okres 6 miesięcy u kobiet z PCOS pomimo, iż nie prowadzi do istotnego wzrostu masy ciała oraz obwodu talii to powoduje znamienny wzrost surowiczych stężeń insuliny, TG, TCh oraz HDL-Ch. Wpływa także na wzrost dobowych wartości BP oraz HR. Stosowanie EE+DRSP przez okres 6 miesięcy u kobiet z PCOS chociaż powoduje wzrost masy tkanki tłuszczowej to nie prowadzi do znamiennej zmiany insulinooporności i stężeń lipidów poza wzrostem stężenia TG w surowicy. Preparat ten nie ma wpływu na dobowe wartości BP i HR najpewniej na skutek natriuretycznego działania DRSP. Pomimo odmiennego wpływu obydwu badanych preparatów na parametry antropometryczne zarówno jeden jak i drugi niekorzystnie wpływają na wskaźniki insulinooporności/insulinowrażliwości (wzrost wartości HOMA oraz spadek QUICKI i FGIR).
- Stosowanie EE+CPA jak i EE+DRSP przez okres 6 miesięcy u kobiet z PCOS powoduje wzrost stężenia CRP w surowicy. Stosowanie preparatu EE+DRSP dodatkowo prowadzi do znamiennej zmiany stężenia fibrynogenu w surowicy.
- Stosowanie EE+CPA jak i EE+DRSP przez okres 6 miesięcy nie wpływa na wartość PWV (wskaźnik dysfunkcji śródbłonna).
- Stosowanie EE+DRSP przez okres 6 miesięcy prowadzi do wzrostu stężenia chemeryny oraz spadku MCP-1 w surowicy. Żaden ze stosowanych preparatów nie ma istotnego wpływu na surowicze stężenia sVCAM-1 i IL-10.

7. STRESZCZENIE

7.1 Streszczenie w języku polskim

Zespół wielotorbielowatych jajników (PCOS) będący najczęściej występującą endokrynopatią u kobiet w wieku rozrodczym, poza zaburzeniami miesiączkowania, płodności i objawami hiperandrogenemii, charakteryzuje insulinooporność i wynikająca z niej hiperinsulinemia, które prowadzą do zaburzeń gospodarki węglowodanowej oraz lipidowej i w konsekwencji zwiększają ryzyko rozwoju miażdżycy a co za tym idzie chorób układu sercowo-naczyniowego (ChUSN). Najczęstszą metodą farmakoterapii PCOS są doustne środki antykoncepcyjne (DŚA), które poza regulacją krwawień miesiączkowych i zmniejszeniem objawów hiperandrogenemii, mogą prowadzić do wzrostu ciśnienia tętniczego oraz zwiększać ryzyko powikłań zakrzepowo-zatorowych przyczyniając się do rozwoju ChUSN. Celem niniejszej pracy była ocena wpływu stosowania DŚA na klasyczne czynniki ryzyka rozwoju ChUSN oraz wybrane wskaźniki stanu zapalnego, dysfunkcji śródbłonna oraz surowicze stężenia cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy u kobiet z PCOS. **MATERIAŁ I METODY:** Do badania zakwalifikowano 42 kobiety z rozpoznanym (według kryteriów rotterdamских) PCOS w wieku od 20 do 36 lat. Pacjentki zostały losowo przydzielone do terapii jednym z dwóch preparatów doustnej antykoncepcji: EE+CPA (preparat zawierający 35 µg etynyloestradiolu + 2 mg octanu cyproteronu) (n=21) lub EE+DRSP (preparat zawierający 20 µg etynyloestradiolu + 3 mg drospirenonu) (n=21). Okres 6 miesięcznej terapii ukończyło 18 kobiet w grupie EE+CPA i 15 kobiet w grupie EE+DRSP. Przed leczeniem i po jego zakończeniu u wszystkich uczestniczek wykonano pomiary antropometryczne w tym pomiar ilości tkanki tłuszczowej całego ciała metodą bioimpedancji, całodobowy pomiar ciśnienia tętniczego oraz badanie prędkości przepływu fali tętna (PWV) za pomocą metody tonometrii aplanacyjnej. Poza oceną wskaźników androgenemii oznaczono także w surowicy stężenia insuliny i glukozy na czczo, fibrynogenu, białka C-reaktywnego (CRP), lipidów oraz wybranych cytokin [chemeryny, białka chemotaktycznego dla monocytów 1 (MCP-1), rozpuszczalnej formy naczyniowej cząsteczki przylegania komórkowego typu 1 (sVCAM-1) oraz interleukiny-10 (IL-10)]. **WYNIKI:** Po 6 miesiącach terapii DŚA

w grupie EE+DRSP zaobserwowano nieznaczny wzrost całkowitej masy ciała wraz ze wzrostem masy całkowitej tkanki tłuszczowej ($p=0.08$) oraz znamieny spadek procentowej zawartości wody w organizmie. Zmian takich nie zaobserwowano w grupie EE+CPA. Niemniej jednak w obydwu grupach zaobserwowano znamieny wzrost wartości wskaźnika oporności na insulinę HOMA oraz spadek wskaźników insulinowrażliwości QUICKI i FGIR. Zmiany te korespondowały ze wzrostem surowiczych stężeń insuliny, ale tylko w grupie EE+CPA wzrost ten był znamieny statystycznie ($p<0.05$). Nie zaobserwowano natomiast aby zmiany te korelowały z obserwowanymi zmianami w zawartości całkowitej tkanki tłuszczowej, wskaźników androgenemii oraz stężenia globuliny wiążącej hormony płciowe (SHBG) w surowicy. W obydwu grupach zaobserwowano także znamieny wzrost stężenia CRP oraz triglicerydów (TG) w surowicy, a w grupie EE+CPA także znamieny wzrost stężenia cholesterolu całkowitego (TCh) oraz HDL-Ch. Stosowanie natomiast EE+DRSP prowadziło do znamienego obniżenia stężenia MCP-1 oraz znamienego wzrostu stężenia fibrynogenu i chemeryny w surowicy. Żaden z preparatów nie miał wpływu na surowicze stężenia sVCAM-1 oraz IL-10. W grupie EE+CPA doszło do znamienego wzrostu dobowych wartości skurczowego (SBP) i rozkurczowego (DBP) ciśnienia tętniczego oraz przyspieszenia średniej akcji serca (HR). Stosowanie EE+DRSP nie miało wpływu na dobowe wartości ciśnienia tętniczego i tętna. W żadnej z grup nie zaobserwowano zmian w wartości PWV. PODSUMOWANIE: Stosowanie preparatów DŚA zawierających EE+CPA oraz EE+DRSP u kobiet z PCOS wpływa niekorzystnie na wskaźniki insulinooporności/insulinowrażliwości oraz znamienie podwyższa surowicze stężenia CRP i TG. Stosowanie EE+DRSP dodatkowo prowadzi do wzrostu stężenia fibrynogenu oraz chemeryny i spadku stężenia MCP-1 w surowicy. EE+CPA powoduje wzrost dobowych wartości ciśnienia tętniczego i przyspieszenie HR. Działania takiego nie wywiera EE+DRSP co najpewniej wynika z natriuretycznego działania DRSP. Żaden ze stosowanych preparatów nie miał istotnego wpływu na stężenia sVCAM-1, IL-10 oraz wartość PWV. WNIOSKI: Wpływ DŚA na klasyczne czynniki ryzyka rozwoju ChUSN oraz wybrane wskaźniki stanu zapalnego, dysfunkcji śródbłonna oraz surowicze stężenia cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy u kobiet z PCOS jest bardzo zróżnicowany i zależy od zawartej w nich dawki EE jak i składowej gestagennej.

7.2 Abstract in English (streszczenie w języku angielskim)

Polycystic ovary syndrome (PCOS) being the most frequent endocrinopathy in reproductive age women apart from menstrual disturbances, impaired fertility and signs of hyperandrogenaemia is characterized by insulin resistance and its consequent hyperinsulinaemia, which impair the carbohydrate and lipid metabolism and as a consequence increase the risk of atherosclerosis and cardiovascular disease (CVD). Oral contraceptives (OC) are most common pharmacotherapy of PCOS, which apart from the induction of regular menses and the alleviation of signs of hyperandrogenaemia may increase blood pressure and the risk of thromboembolic events, which in turn may lead to the development of CVD. The aim of the present study was to evaluate the effects of OC on the classic CVD risk factors and the selected markers of inflammation, endothelial dysfunction and serum concentrations of cytokines involved in the pathogenesis of atherosclerosis in women with PCOS. **MATERIALS AND METHODS:** In total 42 women aged 20 – 36 years with PCOS (diagnosed according to the “Rotterdam” criteria) were included into the study. They were randomly assigned to therapy with an OC containing 35 µg of ethinylestradiol and 2 mg of cyproterone acetate) (EE+CPA group, n=21) or 20 µg of ethinylestradiol and 3 mg of drospirenone) (EE+DRSP group, n=21). The six month treatment period was completed by 18 women from the EE+CPA and 15 women from the EE+DRSP group. At baseline and after 6 months of treatment the anthropometric measures including total body fat using the bioimpedance method, the 24 h blood pressure measurement and pulse wave velocity (PWV) using the applanation tonometry method were measured. Also apart from indices of hyperandrogenaemia serum concentrations of fasting insulin, fibrinogen, C-reactive protein, lipids and the selected cytokines [chemerin, monocyte chemoattractant protein (MCP-1), soluble vascular cell adhesion molecule (sVCAM-1) and interleukin-10 (IL-10)] were measured. **RESULTS:** After 6 months in the EE+DRSP group, a slight increase in the total body mass together with the total fat mass ($P=0.08$) and a significant decrease in the percentage of total body water were observed. Such changes were not noted in the EE+CPA group. Nevertheless, in both groups a significant increase of the HOMA index and a significant decrease in the QUICKI and FGIR indexes were observed. These changes corresponded

with the increase of fasting serum insulin concentrations but this correlation was only statistically significant in the EE+CPA group ($p < 0.05$). In contrast, these changes did not correlate with the changes in total fat mass, indices of hyperandrogenaemia or serum sex hormone binding globulin (SHBG) concentrations. In both groups a significant increase in serum CRP and triglycerides (TG) concentrations were noted and additionally in the EE+CPA group serum total cholesterol (TCh) and HDL-Ch concentrations increased. The use of EE+DRSP lead to a significant decrease in serum MCP-1 concentrations. Additionally, in the EE+CPA group a significant rise in serum fibrinogen and chemerin concentrations were observed. In the EE+CPA group there was a significant increase in systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure values as well as the mean heart rate (HR) during the whole day. The use of EE+DRSP did not influence daily blood pressure or HR values. In none of the two studied groups a change in PWV were noted. SUMMARY: The use of OC containing EE+CPA or EE+DRSP in women with PCOS impairs the indices of insulin resistance/sensitivity and significantly increases serum CRP and TG concentrations. Additionally, the use of the EE+DRSP increases serum fibrinogen and chemerin concentrations and decreases MCP-1. The use of EE+CPA increases blood pressure and HR, whereas EE+DRSP is devoid of such effects due to the natriuretic effect of DRSP. None of the two studied preparations lead to changes in serum sVCAM-1, IL-10 concentrations or PWV values. CONCLUSIONS: The effects of OC on the classical markers of CV risk and the selected markers of inflammation, endothelial dysfunction or serum concentrations of cytokines which take part in the pathogenesis of atherosclerosis in women with PCOS is very complex and depends on the dose of EE as well as the type of progestin.

8. ANEKS

NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
PRZY GDAŃSKIM UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a
telefax 58/349-10-11 - sekretariat, tel. 58/349-12-60 - przewodniczący

NKEBN/26/2011

Gdańsk, 2011-03-21

Pan

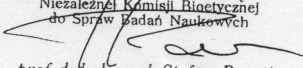
Dr hab. n. med. Dominik Rachoń
Kierownik Zakładu Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej
Międzywydziałowy Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny

W odpowiedzi na zgłoszenie badań z dnia 5.01.2011 r. na temat:
„Ocena wpływu stosowania hormonalnych środków antykoncepcyjnych na wybrane czynniki ryzyka rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego u kobiet z zespołem wielotorbielowatych jajników” (praca na stopień doktora nauk medycznych lek. med. Moniki Kuligowskiej-Jakubowskiej – słuchaczki II roku Dziennych Studiów Doktoranckich GUMed, planowana do przeprowadzenia we współpracy z Katedrą Żywienia Klinicznego oraz Zakładem Nadciśnienia Tętniczego Katedry Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii GUMed) - Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym na posiedzeniu w dniu 27 stycznia 2011 roku zapoznała się z wyżej wymienionym projektem pracy i – po uzupełnieniu w.w. zgłoszenia badań i wyjaśnieniu wątpliwości Komisji (pismo badacza z dnia 3.03.2011 r.) - wyraża zgodę na prowadzenie tej pracy w zakresie przedstawionym we wniosku, gdyż są to badania poznawcze, nie stanowiące istotnego zagrożenia dla zdrowia badanych osób.

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA
DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3A
telefax 058 349 10 11

PRZEWODNICZĄCY

Niezależnej Komisji Bioetycznej
do Spraw Badań Naukowych


prof. dr hab. med. Stefan Raszeja

9. SPIS RYCIN I TABEL

Rycina 1. Schemat badania i udział kobiet na poszczególnych jego etapach.	30
Rycina 2. Prędkość fali tętna (PWV) w odcinku szyjno-udowym (na podstawie Cardiovascular Ultrasound 1999-2011 BioMed Central Ltd)	33
Tabela 1. Wskaźniki insulinooporności/insulinowrażliwości.	37
Tabela 2. Charakterystyka badanych kobiet zakwalifikowanych do terapii dwoma różnymi DŚA (EE+CPA lub EE+DRSP).	40
Tabela 3. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na BMI, obwód talii i skład ciała.	42
Tabela 4. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na wskaźniki androgenemii.	43
Tabela 5. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na dobowe wartości ciśnienia tętniczego oraz akcji serca.	44
Tabela 6. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane parametry profilu lipidowego i gospodarki węglowodanowej.	46
Tabela 7. Korelacje pomiędzy insulinemią, wskaźnikami insulinooporności/insulino-wrażliwości a zmianą w zawartości tkanki tłuszczowej oraz badanymi wskaźnikami androgenemii w grupie pacjentek przyjmujących preparat EE+DRSP. W tabeli przedstawiono współczynnik korelacji R oraz wartości p.	47
Tabela 8. Korelacje pomiędzy insulinemią, wskaźnikami insulinooporności/insulino-wrażliwości a badanymi wskaźnikami androgenemii w grupie pacjentek przyjmujących preparat EE+CPA. W tabeli przedstawiono współczynnik korelacji R oraz wartości p.	47
Tabela 9. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane wskaźniki stanu zapalnego.	48
Tabela 10. Korelacje pomiędzy wybranymi wskaźnikami stanu zapalnego oraz cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy i zaburzeń metabolicznych a parametrami antropometrycznymi w grupie pacjentek przyjmujących preparat EE+CPA. W tabeli przedstawiono współczynniki korelacji R oraz wartości p.	48

Tabela 11. Korelacje pomiędzy wybranymi wskaźnikami stanu zapalnego oraz cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy i zaburzeń metabolicznych a parametrami antropometrycznymi w grupie pacjentek przyjmujących preparat EE+DSRP. W tabeli przedstawiono współczynniki korelacji R oraz wartości p.	49
Tabela 12. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na wartość PWV.....	49
Tabela 13. Porównanie wpływu stosowania 6 miesięcznej terapii dwoma różnymi DŚA na wybrane surowicze stężenia cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy i zaburzeń metabolicznych.....	50

10. LITERATURA

- Ademoglu E, Berberoglu Z, Carlioglu A, Dellal F, Gorar S, Alphan Z, Uysal S, Karakurt F. 2014. Higher levels of circulating chemerin in both lean and obese patients with polycystic ovary syndrome. *Minerva ginecologica* 66(6):535-542.
- Aksan G, Inci S, Nar G, Soylu K, Gedikli O, Yuksel S, Ozdemir M, Nar R, Meric M, Sahin M. 2014. Association of serum chemerin levels with the severity of coronary artery disease in patients with metabolic syndrome. *International journal of clinical and experimental medicine* 7(12):5461-5468.
- Aydin K, Cinar N, Aksoy DY, Bozdog G, Yildiz BO. 2013. Body composition in lean women with polycystic ovary syndrome: effect of ethinyl estradiol and drospirenone combination. *Contraception* 87(3):358-362.
- Azziz R, Adashi EY. 2015. Stein and Leventhal: 80 years on. *American journal of obstetrics and gynecology*.
- Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE and others. 2006. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91(11):4237-4245.
- Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. 2004. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89(6):2745-2749.
- Baldani DP, Skrgatic L, Ougouag R. 2015. Polycystic Ovary Syndrome: Important Underrecognised Cardiometabolic Risk Factor in Reproductive-Age Women. *International journal of endocrinology* 2015:786362.
- Balen AH, Laven JS, Tan SL, Dewailly D. 2003. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Human reproduction update* 9(6):505-514.
- Bentley-Lewis R, Seely E, Dunaif A. 2011. Ovarian hypertension: polycystic ovary syndrome. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 40(2):433-449, ix-x.
- Berneis K, Rizzo M, Hersberger M, Rini GB, Di Fede G, Pepe I, Spinass GA, Carmina E. 2009. Atherogenic forms of dyslipidaemia in women with polycystic ovary syndrome. *International journal of clinical practice* 63(1):56-62.
- Bilgicir O, Kebapcilar L, Taner C, Bilgicir F, Kebapcilar A, Bozkaya G, Yildiz Y, Yuksel A, Sari I. 2009. The effect of ethinylestradiol (EE)/cyproterone acetate (CA)

- and EE/CA plus metformin treatment on adhesion molecules in cases with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Internal medicine* 48(14):1193-1199.
- Bird ST, Hartzema AG, Brophy JM, Etminan M, Delaney JA. 2013. Risk of venous thromboembolism in women with polycystic ovary syndrome: a population-based matched cohort analysis. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 185(2):E115-120.
- Bisoendial RJ, Boekholdt SM, Vergeer M, Stroes ES, Kastelein JJ. 2010. C-reactive protein is a mediator of cardiovascular disease. *European heart journal* 31(17):2087-2091.
- Boden G. 2011. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 18(2):139-143.
- Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Visser GH, Fauser BC, Macklon NS. 2006. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Human reproduction update* 12(6):673-683.
- Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. 2007. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* 148(10):4687-4694.
- Burchall G, Linden MD, Teede H, Piva TJ. 2011. Hemostatic abnormalities and relationships to metabolic and hormonal status in polycystic ovarian syndrome. *Trends in cardiovascular medicine* 21(1):6-14.
- Carmina E, Legro RS, Stamets K, Lowell J, Lobo RA. 2003. Difference in body weight between American and Italian women with polycystic ovary syndrome: influence of the diet. *Human reproduction* 18(11):2289-2293.
- Cecelja M, Chowienzyk P. 2009. Dissociation of aortic pulse wave velocity with risk factors for cardiovascular disease other than hypertension: a systematic review. *Hypertension* 54(6):1328-1336.
- Chen L, Xu WM, Zhang D. 2014. Association of abdominal obesity, insulin resistance, and oxidative stress in adipose tissue in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility* 102(4):1167-1174 e1164.
- Christakou C, Kollias A, Piperi C, Katsikis I, Panidis D, Diamanti-Kandarakis E. 2014. The benefit-to-risk ratio of common treatments in PCOS: effect of oral contraceptives versus metformin on atherogenic markers. *Hormones* 13(4):488-497.
- Chu SH, Lee MK, Ahn KY, Im JA, Park MS, Lee DC, Jeon JY, Lee JW. 2012. Chemerin and adiponectin contribute reciprocally to metabolic syndrome. *PloS one* 7(4):e34710.
- Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Franks S, Gambineri A, Kelestimur F, Macut D, Micic D, Pasquali R and others. 2014.

The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 171(4):P1-29.

Cruickshank K, Riste L, Anderson SG, Wright JS, Dunn G, Gosling RG. 2002. Aortic pulse-wave velocity and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function? *Circulation* 106(16):2085-2090.

Dardzińska JA, Rachoń D, Kuligowska-Jakubowska M, Aleksandrowicz-Wrona E, Płoszynski A, Wyrzykowski B, Łysiak-Szydłowska W. 2014. Effects of metformin or an oral contraceptive containing cyproterone acetate on serum c-reactive protein, interleukin-6 and soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 122(2):118-125.

De Leo V, Di Sabatino A, Musacchio MC, Morgante G, Scolaro V, Cianci A, Petraglia F. 2010. Effect of oral contraceptives on markers of hyperandrogenism and SHBG in women with polycystic ovary syndrome. *Contraception* 82(3):276-280.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29(6):313-326.

Diabetologiczne PT. 2014. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2014. *Diabetologia Kliniczna* 3(Suplement A):A3.

Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. 2012. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocrine reviews* 33(6):981-1030.

Diamanti-Kandarakis E, Paterakis T, Alexandraki K, Piperi C, Aessopos A, Katsikis I, Katsilambros N, Kreatsas G, Panidis D. 2006a. Indices of low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin. *Human reproduction* 21(6):1426-1431.

Diamanti-Kandarakis E, Paterakis T, Kandarakis HA. 2006b. Indices of low-grade inflammation in polycystic ovary syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1092:175-186.

Dinger JC, Heinemann LA, Kuhl-Habich D. 2007. The safety of a drospirenone-containing oral contraceptive: final results from the European Active Surveillance Study on oral contraceptives based on 142,475 women-years of observation. *Contraception* 75(5):344-354.

- Dong B, Ji W, Zhang Y. 2011. Elevated serum chemerin levels are associated with the presence of coronary artery disease in patients with metabolic syndrome. *Internal medicine* 50(10):1093-1097.
- Dunaif A. 1997. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrine reviews* 18(6):774-800.
- Dunaif A, Fauser BC. 2013. Renaming PCOS--a two-state solution. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98(11):4325-4328.
- Dunaif A, Xia J, Book CB, Schenker E, Tang Z. 1995. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical investigation* 96(2):801-810.
- Erdogan M, Karadeniz M, Alper GE, Tamsel S, Uluer H, Caglayan O, Saygili F, Yilmaz C. 2008. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and cardiovascular risk factors in polycystic ovary syndrome. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 116(3):143-147.
- Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, Gonzalez F. 2011. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertility and sterility* 95(3):1048-1058 e1041-1042.
- Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giugliano D. 2003. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88(3):1055-1058.
- Franks S, Berga SL. 2012. Does PCOS have developmental origins? *Fertility and sterility* 97(1):2-6.
- Franks S, McCarthy M. 2004. Genetics of ovarian disorders: polycystic ovary syndrome. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 5(1):69-76.
- Fruzzetti F, Perini D, Lazzarini V, Parrini D, Gambacciani M, Genazzani AR. 2010. Comparison of effects of 3 mg drospirenone plus 20 mug ethinyl estradiol alone or combined with metformin or cyproterone acetate on classic metabolic cardiovascular risk factors in nonobese women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility* 94(5):1793-1798.
- Gallo MF, Lopez LM, Grimes DA, Schulz KF, Helmerhorst FM. 2008. Combination contraceptives: effects on weight. *The Cochrane database of systematic reviews*(4):CD003987.
- Giribela CR, Consolim-Colombo FM, Nisenbaum MG, Moraes TL, Giribela AH, Baracat EC, Melo NR. 2015. Effects of a combined oral contraceptive containing 20 mcg of ethinylestradiol and 3 mg of drospirenone on the blood pressure, renin-angiotensin-aldosterone system, insulin resistance, and

androgenic profile of healthy young women. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 31(11):912-915.

- Gode F, Karagoz C, Posaci C, Saatli B, Uysal D, Secil M, Akdeniz B. 2011. Alteration of cardiovascular risk parameters in women with polycystic ovary syndrome who were prescribed to ethinyl estradiol-cyproterone acetate. *Archives of gynecology and obstetrics* 284(4):923-929.
- Gonzalez F. 2012. Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction. *Steroids* 77(4):300-305.
- Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. 2007. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *The Journal of biological chemistry* 282(38):28175-28188.
- Guido M, Romualdi D, Giuliani M, Suriano R, Selvaggi L, Apa R, Lanzone A. 2004. Drospirenone for the treatment of hirsute women with polycystic ovary syndrome: a clinical, endocrinological, metabolic pilot study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89(6):2817-2823.
- Halperin IJ, Kumar SS, Stroup DF, Laredo SE. 2011. The association between the combined oral contraceptive pill and insulin resistance, dysglycemia and dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Human reproduction* 26(1):191-201.
- Hansson GK. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine* 352(16):1685-1695.
- Hu W, Qiao J, Yang Y, Wang L, Li R. 2011. Elevated C-reactive protein and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with polycystic ovary syndrome. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 157(1):53-56.
- Jing Z, Liang-Zhi X, Tai-Xiang W, Ying T, Yu-Jian J. 2008. The effects of Diane-35 and metformin in treatment of polycystic ovary syndrome: an updated systematic review. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 24(10):590-600.
- Jonard S, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Pigny P, Decanter C, Dewailly D. 2003. Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? *Human reproduction* 18(3):598-603.
- Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, Danesh J. 2010. Emerging Risk Factors Collaboration. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* 375(9709):132-140.

- Karabulut A, Demirlenk S, Sevkett O. 2012. Effects of ethinyl estradiol-cyproterone acetate treatment on metabolic syndrome, fat distribution and carotid intima media thickness in polycystic ovary syndrome. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 28(4):245-248.
- Karakurt F, Gumus, II, Bavbek N, Kargili A, Koca C, Selcoki Y, Ozbek M, Kosar A, Akcay A. 2008. Increased thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen levels as a clue for prothrombotic state in polycystic ovary syndrome. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 24(9):491-497.
- Katulski K, Czyzyk A, Męczekalski B. 2012. [The controversies in the diagnosis of polycystic ovary syndrome]. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 33(193):32-37.
- Katulski K, Męczekalski B. 2010. [Natural history of polycyclic ovary syndrome]. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 29(169):58-60.
- Kaya MG, Calapkorur B, Karaca Z, Yildirim S, Celik A, Akpek M, Unluhizarci K, Kelestimur F. 2012. The effects of treatment with drospirenone/ethinyl oestradiol alone or in combination with metformin on elastic properties of aorta in women with polycystic ovary syndrome. *Clinical endocrinology* 77(6):885-892.
- Kebapcilar L, Taner CE, Kebapcilar AG, Sari I. 2009. High mean platelet volume, low-grade systemic coagulation and fibrinolytic activation are associated with androgen and insulin levels in polycystic ovary syndrome. *Archives of gynecology and obstetrics* 280(2):187-193.
- Kershaw EE, Flier JS. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89(6):2548-2556.
- Kort DH, Kostolias A, Sullivan C, Lobo RA. 2015. Chemerin as a marker of body fat and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 31(2):152-155.
- Kressel G, Trunz B, Bub A, Hulsmann O, Wolters M, Lichtinghagen R, Stichtenoth DO, Hahn A. 2009. Systemic and vascular markers of inflammation in relation to metabolic syndrome and insulin resistance in adults with elevated atherosclerosis risk. *Atherosclerosis* 202(1):263-271.
- Kuligowska-Jakubowska M, Dardzińska JA, Rachoń D. 2012. Zaburzenia gospodarki węglowodanowej u kobiet z zespołem wielotorbielowatych jajników (PCOS). *Diabetologia Kliniczna* 1(5):185-195.
- Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, Ducimetiere P, Benetos A. 2001. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and

- cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 37(5):1236-1241.
- Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H and others. 2006. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *European heart journal* 27(21):2588-2605.
- Lee YH, Pratley RE. 2005. The evolving role of inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Current diabetes reports* 5(1):70-75.
- Legro RS, Kusanman AR, Dodson WC, Dunaif A. 1999. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84(1):165-169.
- Lehrke M, Becker A, Greif M, Stark R, Laubender RP, von Ziegler F, Lebherz C, Tittus J, Reiser M, Becker C and others. 2009. Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 161(2):339-344.
- Lidegaard O, Lokkegaard E, Svendsen AL, Agger C. 2009. Hormonal contraception and risk of venous thromboembolism: national follow-up study. *Bmj* 339:b2890.
- Lidegaard O, Nielsen LH, Skovlund CW, Skjeldestad FE, Lokkegaard E. 2011. Risk of venous thromboembolism from use of oral contraceptives containing different progestogens and oestrogen doses: Danish cohort study, 2001-9. *Bmj* 343:d6423.
- Lim SS, Norman RJ, Davies MJ, Moran LJ. 2013. The effect of obesity on polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 14(2):95-109.
- Lo JC, Feigenbaum SL, Yang J, Pressman AR, Selby JV, Go AS. 2006. Epidemiology and adverse cardiovascular risk profile of diagnosed polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91(4):1357-1363.
- Luque-Ramirez M, Alvarez-Blasco F, Botella-Carretero JJ, Martinez-Bermejo E, Lasuncion MA, Escobar-Morreale HF. 2007a. Comparison of ethinyl-estradiol plus cyproterone acetate versus metformin effects on classic metabolic cardiovascular risk factors in women with the polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92(7):2453-2461.
- Luque-Ramirez M, Alvarez-Blasco F, Mendieta-Azcona C, Botella-Carretero JJ, Escobar-Morreale HF. 2007b. Obesity is the major determinant of the abnormalities in blood pressure found in young women with the polycystic

ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92(6):2141-2148.

Luque-Ramirez M, Mendieta-Azcona C, Alvarez-Blasco F, Escobar-Morreale HF. 2009a. Effects of metformin versus ethinyl-estradiol plus cyproterone acetate on ambulatory blood pressure monitoring and carotid intima media thickness in women with the polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility* 91(6):2527-2536.

Luque-Ramirez M, Mendieta-Azcona C, del Rey Sanchez JM, Maties M, Escobar-Morreale HF. 2009b. Effects of an antiandrogenic oral contraceptive pill compared with metformin on blood coagulation tests and endothelial function in women with the polycystic ovary syndrome: influence of obesity and smoking. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 160(3):469-480.

Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A and others. 2013. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of hypertension* 31(7):1281-1357.

Manneras-Holm L, Baghaei F, Holm G, Janson PO, Ohlsson C, Lonn M, Stener-Victorin E. 2011. Coagulation and fibrinolytic disturbances in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96(4):1068-1076.

Marshall JC, Dunaif A. 2012. Should all women with PCOS be treated for insulin resistance? *Fertility and sterility* 97(1):18-22.

Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Hofman A, van Popele NM, Bos ML, Schalekamp MA, Asmar R, Reneman RS, Hoeks AP, Breteler MM and others. 2006. Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* 113(5):657-663.

Mes-Krowinkel MG, Louwers YV, Mulders AG, de Jong FH, Fauser BC, Laven JS. 2014. Influence of oral contraceptives on anthropomorphic, endocrine, and metabolic profiles of anovulatory polycystic ovary syndrome patients. *Fertility and sterility* 101(6):1757-1765 e1751.

Meyer C, McGrath BP, Teede HJ. 2005. Overweight women with polycystic ovary syndrome have evidence of subclinical cardiovascular disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90(10):5711-5716.

Meyer C, McGrath BP, Teede HJ. 2007. Effects of medical therapy on insulin resistance and the cardiovascular system in polycystic ovary syndrome. *Diabetes care* 30(3):471-478.

- Moore AM, Campbell RE. 2015. The neuroendocrine genesis of polycystic ovary syndrome: A role for arcuate nucleus GABA neurons. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*.
- Moran C, Arriaga M, Rodriguez G, Moran S. 2012a. Obesity differentially affects phenotypes of polycystic ovary syndrome. *International journal of endocrinology* 2012:317241.
- Moran LJ, Misso ML, Wild RA, Norman RJ. 2010. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update* 16(4):347-363.
- Moran LJ, Noakes M, Wittert GA, Clifton PM, Norman RJ. 2012b. Weight loss and vascular inflammatory markers in overweight women with and without polycystic ovary syndrome. *Reproductive biomedicine online* 25(5):500-503.
- Nader S, Diamanti-Kandarakis E. 2007. Polycystic ovary syndrome, oral contraceptives and metabolic issues: new perspectives and a unifying hypothesis. *Human reproduction* 22(2):317-322.
- Nasiek M, Kos-Kudla B, Ostrowska Z, Marek B, Kudla M, Sieminska L, Kajdaniuk D, Foltyn W, Zemczak A. 2007. Acute phase proteins: C-reactive protein and fibrinogen in young women with polycystic ovary syndrome. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP* 14(1):23-28.
- Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. 2007. Polycystic ovary syndrome. *Lancet* 370(9588):685-697.
- Ntaios G, Gatselis NK, Makaritsis K, Dalekos GN. 2013. Adipokines as mediators of endothelial function and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 227(2):216-221.
- Odutayo A, Cherney D, Miller J, Ahmed SB, Lai V, Dunn S, Pun N, Moineddin R, Hladunewich MA. 2015. Transdermal contraception and the renin-angiotensin-aldosterone system in premenopausal women. *American journal of physiology Renal physiology* 308(6):F535-540.
- Palomba S, Falbo A, Russo T, Rivoli L, Orio M, Cosco AG, Vero R, Capula C, Tolino A, Zullo F and others. 2012. The risk of a persistent glucose metabolism impairment after gestational diabetes mellitus is increased in patients with polycystic ovary syndrome. *Diabetes care* 35(4):861-867.
- Park JC, Lim SY, Jang TK, Bae JG, Kim JI, Rhee JH. 2011. Endometrial histology and predictable clinical factors for endometrial disease in women with polycystic ovary syndrome. *Clinical and experimental reproductive medicine* 38(1):42-46.
- Pasquali R. 2006. Obesity and androgens: facts and perspectives. *Fertility and sterility* 85(5):1319-1340.

- Pasquali R, Gambineri A, Pagotto U. 2006. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 113(10):1148-1159.
- Pimenta E. 2012. Hypertension in women. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 35(2):148-152.
- Puder JJ, Varga S, Kraenzlin M, De Geyter C, Keller U, Muller B. 2005. Central fat excess in polycystic ovary syndrome: relation to low-grade inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90(11):6014-6021.
- Rachoń D. 2012. Differential diagnosis of hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 120(4):205-209.
- Randeva HS, Tan BK, Weickert MO, Lois K, Nestler JE, Sattar N, Lehnert H. 2012. Cardiometabolic aspects of the polycystic ovary syndrome. *Endocrine reviews* 33(5):812-841.
- Rautio K, Tapanainen JS, Ruukonen A, Morin-Papunen LC. 2005. Effects of metformin and ethinyl estradiol-cyproterone acetate on lipid levels in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 152(2):269-275.
- Romualdi D, De Cicco S, Busacca M, Gagliano D, Lanzone A, Guido M. 2013. Clinical efficacy and metabolic impact of two different dosages of ethinyl-estradiol in association with drospirenone in normal-weight women with polycystic ovary syndrome: a randomized study. *Journal of endocrinological investigation* 36(8):636-641.
- Rotterdam EA-SPCWG. 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility* 81(1):19-25.
- Rourke JL, Dranse HJ, Sinal CJ. 2013. Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 14(3):245-262.
- Safar ME, Blacher J, Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Guyonvarc'h PM, London GM. 2002. Central pulse pressure and mortality in end-stage renal disease. *Hypertension* 39(3):735-738.
- Sam S, Dunaif A. 2003. Polycystic ovary syndrome: syndrome XX? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 14(8):365-370.

- Samy N, Hashim M, Sayed M, Said M. 2009. Clinical significance of inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: their relationship to insulin resistance and body mass index. *Disease markers* 26(4):163-170.
- Sitruk-Ware R, Nath A. 2013. Characteristics and metabolic effects of estrogen and progestins contained in oral contraceptive pills. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 27(1):13-24.
- Smith DA, Irving SD, Sheldon J, Cole D, Kaski JC. 2001. Serum levels of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 are decreased in patients with unstable angina. *Circulation* 104(7):746-749.
- Soares GM, Vieira CS, de Paula Martins W, Dos Reis RM, de Sa MF, Ferriani RA. 2009. Metabolic and cardiovascular impact of oral contraceptives in polycystic ovary syndrome. *International journal of clinical practice* 63(1):160-169.
- Stepito NK, Cassar S, Joham AE, Hutchison SK, Harrison CL, Goldstein RF, Teede HJ. 2013. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp. *Human reproduction* 28(3):777-784.
- Stocco B, Fumagalli HF, Franceschini SA, Martinez EZ, Marzocchi-Machado CM, de Sa MF, Toloi MR. 2015. Comparative study of the effects of combined oral contraceptives in hemostatic variables: an observational preliminary study. *Medicine* 94(4):e385.
- Tarkun I, Arslan BC, Canturk Z, Turemen E, Sahin T, Duman C. 2004. Endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome: relationship with insulin resistance and low-grade chronic inflammation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89(11):5592-5596.
- Teede HJ, Meyer C, Hutchison SK, Zoungas S, McGrath BP, Moran LJ. 2010. Endothelial function and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: the effects of medical therapy. *Fertility and sterility* 93(1):184-191.
- Thomson RL, Brinkworth GD, Noakes M, Clifton PM, Norman RJ, Buckley JD. 2012. The effect of diet and exercise on markers of endothelial function in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *Human reproduction* 27(7):2169-2176.
- Tonjes A, Fasshauer M, Kratzsch J, Stumvoll M, Bluher M. 2010. Adipokine pattern in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in comparison to normal glucose tolerance and diabetes. *PloS one* 5(11):e13911.
- Ucar A, Yackobovitch-Gavan M, Erol OB, Yekeler E, Saka N, Bac F, Poyrazoglu S, Bundak R, Darendeliler F. 2014. Associations of size at birth and postnatal catch-up growth status with clinical and biomedical characteristics in prepubertal girls with precocious adrenarche: preliminary results. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99(8):2878-2886.

- van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Frolich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westendorp RG, Leiden 85 Plus S. 2002. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 51(4):1088-1092.
- Verit FF. 2010. High sensitive serum C-reactive protein and its relationship with other cardiovascular risk factors in normoinsulinemic polycystic ovary patients without metabolic syndrome. *Archives of gynecology and obstetrics* 281(6):1009-1014.
- Villa J, Pratley RE. 2011. Adipose tissue dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Current diabetes reports* 11(3):179-184.
- Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. 2010. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology* 55(13):1318-1327.
- Vrbikova J, Cibula D. 2005. Combined oral contraceptives in the treatment of polycystic ovary syndrome. *Human reproduction update* 11(3):277-291.
- Vrbikova J, Dvorakova K, Hill M, Starka L. 2006. Weight change and androgen levels during contraceptive treatment of women affected by polycystic ovary. *Endocrine regulations* 40(4):119-123.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 112(12):1796-1808.
- Welt CK, Carmina E. 2013. Clinical review: Lifecycle of polycystic ovary syndrome (PCOS): from in utero to menopause. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98(12):4629-4638.
- Wild RA, Rizzo M, Clifton S, Carmina E. 2011. Lipid levels in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility* 95(3):1073-1079 e1071-1011.
- Wild S, Pierpoint T, Jacobs H, McKeigue P. 2000. Long-term consequences of polycystic ovary syndrome: results of a 31 year follow-up study. *Human fertility* 3(2):101-105.
- Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S, Thijs L, Ibsen H, Jeppesen J. 2006. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation* 113(5):664-670.
- Wu CQ, Grandi SM, Filion KB, Abenhaim HA, Joseph L, Eisenberg MJ. 2013. Drospirenone-containing oral contraceptive pills and the risk of venous and arterial thrombosis: a systematic review. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 120(7):801-810.

- Xita N, Tsatsoulis A. 2006. Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91(5):1660-1666.
- Yang S, Wang Q, Huang W, Song Y, Feng G, Zhou L, Tan J. 2016. Are serum chemerin levels different between obese and non-obese polycystic ovary syndrome women? *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 32(1):38-41.
- Yildirim B, Sabir N, Kaleli B. 2003. Relation of intra-abdominal fat distribution to metabolic disorders in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility* 79(6):1358-1364.
- Yoo HJ, Choi KM. 2014. Adipokines as a novel link between obesity and atherosclerosis. *World journal of diabetes* 5(3):357-363.
- Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, Butcher EC. 2005. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *The Journal of biological chemistry* 280(41):34661-34666.
- Zhang LH, Rodriguez H, Ohno S, Miller WL. 1995. 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* 92(23):10619-10623.

136 pozycji literatury