

**Gdański Uniwersytet Medyczny**

Mgr Karolina Kuźbicka

**„Polimorfizm genów receptorów estrogenowych  
(ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) a rozwój zespołu metabolicznego  
u kobiet po menopauzie”**

Rozprawa doktorska

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

Zakład Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

**Gdańsk 2015**

*Chciałabym podziękować Promotorowi pracy  
profesorowi Dominikowi Rachoniowi za cenne wskazówki i poświęcony mi czas.*

*Ponadto dziękuję również doktor Annie Woziwodzkiej za pomoc w wykonaniu badań.*

## LISTA SKRÓTÓW ZASTOSOWANYCH W PRACY

**AHA/NHLBI** – (z ang. *American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute*) Narodowy Instytut Serca, Płuc i Krwi

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

**ChNS** – choroba niedokrwienna serca

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

**DBD** – (z ang. *DNA – binding domain*) domena wiążąca DNA

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

**E2** – 17 $\beta$ -estradiol

**ER** – (z ang. *estrogene receptors*) receptory estrogenowe

**ER $\alpha$**  – receptory estrogenowe alfa

**ER $\beta$**  – receptory estrogenowe beta

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

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

**LBD** – (z ang. *ligand binding domain*) domena wiążąca ligand

**MAF** – (z ang. *Minor Allele Frequency*) częstość allelu rzadszego

**MRS** – (z ang. *Menopause Range Scale*) formularz do oceny objawów wypadowych menopauzy

**NO** – tlenek azotu

**OM** – ostatnia miesiączka

**OR** – (z ang. *Odds Ratio*) iloraz szans

**PCR** – (z ang. *Polymerase Chain Reaction*) reakcja łańcuchowej polimerazy

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

**SNP** – (z ang. *single nucleotide polymorphism*) polimorfizm pojedynczego nukleotydu

**TOF MS** – (z ang. *Time Of Flight Mass Spectrometry*) wysokowydajna technologia spektrometria mas oparta na pomiarze czasu przelotu jonów

**Q1-Q3** – przedział międzykwartylowy

## SPIS TREŚCI

1. WSTĘP .....	6
1.1 Zespół metaboliczny .....	6
1.2 Menopauza i estrogeny .....	9
1.3 Molekularne mechanizmy oddziaływania estrogenów .....	10
1.4 Podsumowanie i znaczenie badania .....	11
2. CEL PRACY .....	13
3. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE .....	14
3.1 Materiał badawczy .....	14
3.2 Metody badawcze .....	15
3.2.1 Analiza składu ciała .....	15
3.2.2 Pomiar obwodu pasa .....	15
3.2.3 Pomiar ciśnienia tętniczego .....	15
3.2.4 Pobieranie krwi żyłnej .....	15
3.2.5 Uzyskiwanie surowic .....	16
3.2.6 Izolacja materiału genetycznego .....	16
3.2.7 Analiza wybranych polimorfizmów genów kodujących ER przy użyciu platformy Sequenom MassARRAY .....	17
3.2.8 Pomiar stężenia adiponektyny w surowicy badanych kobiet .....	26
3.2.9 Analiza objawów wypadowych przy użyciu polskiej wersji formularza MRS (z ang. Menopause Range Scale) .....	27
3.2.10 Analiza statystyczna wyników .....	27
4. WYNIKI .....	29
4.1 Częstość występowania ZM i jego składowych wśród badanych kobiet .....	29
4.1.1 Charakterystyka badanych kobiet .....	29
4.1.2 Częstość występowania ZM w badanej grupie kobiet .....	29
4.1.3 Częstość występowania poszczególnych składowych ZM u kobiet spełniających i niepełniających jego kryteriów .....	31
4.2 Ocena wpływu posiadania określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER na występowanie ZM i jego składowych w badanej grupie kobiet .....	32

4.2.1 Częstość występowania poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów genów kodujących ER $\alpha$ i ER $\beta$ .....	32
4.2.2 Ocena wpływu występowania określonych genotypów badanych polimorfizmów genów kodujących ER $\alpha$ i ER $\beta$ na występowanie ZM w badanej grupie kobiet .....	34
4.2.3 Ocena wpływu występowania określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER na występowanie poszczególnych składowych ZM w badanej grupie kobiet .....	37
4.2.4 Ocena wpływu występowania określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER na wskaźniki insulinooporności/wrażliwości, surowicze poziomy adiponektyny oraz CRP w badanej grupie .....	39
4.3 Ocena wpływu posiadania określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER na skład ciała badanych kobiet .....	42
4.4 Ocena wpływu posiadania określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER na występowanie objawów hipiestrogenemii u badanych kobiet .....	45
5. DYSKUSJA .....	47
6. WNIOSKI .....	56
7. STRESZCZENIE .....	57
8. SUMMARY .....	59
9. ANEKS .....	61
10. SPIS RYCIN, TABEL I WYKRESÓW ZAMIESZCZONYCH W PRACY .....	68
10.1 spis rycin .....	68
10.2.spis tabel.....	68
10.3 spis wykresów .....	69
11. LITERATURA .....	70

# 1. WSTĘP

## 1.1 ZESPÓŁ METABOLICZNY

Zespół metaboliczny (ZM) stanowi istotny problem współczesnej medycyny. Jego występowanie rośnie wraz z wiekiem i jest coraz częstsze, co wiąże się głównie z rosnącą epidemią otyłości i siedzącym trybem życia (Ford i wsp., 2008). Według analizy Trzeciego Narodowego Badania Zdrowia i Odżywienia (z ang. *Third National Health and Nutrition Examination*) z lat 1988-1994 przeprowadzonego w Stanach Zjednoczonych 23.7 % populacji w wieku powyżej 20 lat spełniało kryteria rozpoznania ZM (zgodnie z definicją ATP III), natomiast w grupie osób w wieku 60-69 lat odsetek ten wynosił aż 43.5 % (Ford i wsp., 2002). Analiza kolejnego badania z lat 2003-2006 (z ang. *2003-2006 National Health and Nutrition Examination Survey*) wykazała, że odsetek osób po ukończeniu 20 roku życia spełniających kryteria rozpoznania ZM (również według definicji ATP III) zwiększył się do 34.3 % (Ford i wsp., 2010). Z przeprowadzonego w 2002 roku badania NATPOL PLUS wynika, że kryteria rozpoznania ZM (według definicji IDF) spełniało w Polsce 26.2 % społeczeństwa, czyli około 10 milionów osób (Wyrzykowski i wsp., 2005a). W badaniu WOBASZ z 2005 roku wykazano, że kryteria rozpoznania ZM (według definicji NCEP-ATP III z 2005 roku) spełniało w Polsce 23 % mężczyzn i 20 % kobiet w wieku 20-74 lat (Wyrzykowski i wsp., 2005b).

ZM jest zbiorem czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, takich jak: otyłość centralna, podwyższone stężenie triglicerydów, obniżone stężenie cholesterolu HDL, nadciśnienie tętnicze (NT), podwyższone stężenie glikemii na czczo. Czynniki te prowadzą do rozwoju cukrzycy typu 2 (T2DM) oraz choroby niedokrwiennej serca (ChNS). Pacjenci spełniający kryteria ZM mają dwukrotnie wyższe ryzyko zachorowania na ChNS na przestrzeni 5 do 10 lat od jego rozpoznania niż osoby, które nie spełniają kryteriów jego rozpoznania. Ponadto u osób z ZM ryzyko zachorowania na T2DM wzrasta pięciokrotnie (Alberti i wsp., 2009).

Pierwszą definicję ZM zaproponowała Światowa Organizacja Zdrowia w 1998 roku. Osoba spełniała kryteria ZM jeśli wykazano u niej obecność insulinooporności oraz

dwóch dodatkowych cech spośród następujących: otyłość, NT, hipertriglicydemia, obniżenie stężenia cholesterolu HDL lub mikroalbuminuria. Pojęcie insulinooporności nie zostało jednak dokładnie zdefiniowane (Balkau i Charles, 1999). Kolejna definicja ZM została zaproponowana w 2001 roku przez Program Edukacji Cholesterolowej (z ang. *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III – ATP III*), według której osoba spełnia kryteria rozpoznania ZM jeśli występują u niej co najmniej trzy spośród pięciu objawów: otyłość brzuszna (inaczej centralna), NT, hipertriglicydemia, obniżone stężenie cholesterolu HDL, podwyższone stężenie glukozy we krwi (ten czynnik jest spełniony również w przypadku osób z nieprawidłową tolerancją glukozy lub obecnością T2DM). W tej definicji nie pojawia się natomiast pojęcie insulinooporności, gdyż koreluje ona z otyłością centralną. W 2005 roku Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna (z ang. *International Diabetes Federation - IDF*) oraz Narodowy Instytut Serca, Płuc i Krwi - *AHA/NHLBI*) zaproponowali kolejne definicje ZM. IDF uznał otyłość centralną za kryterium niezbędne do rozpoznania ZM. Ponadto do rozpoznania powinny być spełnione dodatkowo dwa z czterech kryteriów: obecność NT, podwyższone stężenie triglicerydów, obniżone stężenie cholesterolu HDL, podwyższony poziom glikemii. W definicji AHA/NHLBI natomiast otyłość centralna nie stanowi czynnika niezbędnego do rozpoznania ZM. Osoba spełnia kryteria rozpoznania ZM gdy występują u niej trzy spośród pięciu następujących cech: otyłość brzuszna, obecność NT, hipertriglicydemia, obniżone stężenie cholesterolu HDL, podwyższony poziom glikemii. Obie definicje różnią się punktami odcięcia definiującymi otyłość brzuszna. Według definicji IDF punktem odcięcia jest obwód pasa równy lub większy niż 80 cm u kobiet i 94 cm u mężczyzn. Natomiast według AHA/NHLBI otyłość brzuszna definiuje się jako obwód pasa równy lub większy niż 88 cm u kobiet i 102 cm u mężczyzn. W 2012 roku próbowano ujednoczyć obie definicje ZM i uznano, że otyłość centralna nie będzie warunkiem niezbędnym do rozpoznania ZM. Nie osiągnięto jednak ostatecznego porozumienia co do punktów odcięcia definiujących otyłość brzuszna (Alberti i wsp, 2009). Porównanie wszystkich proponowanych kryteriów rozpoznania ZM przedstawia Tabela 1.

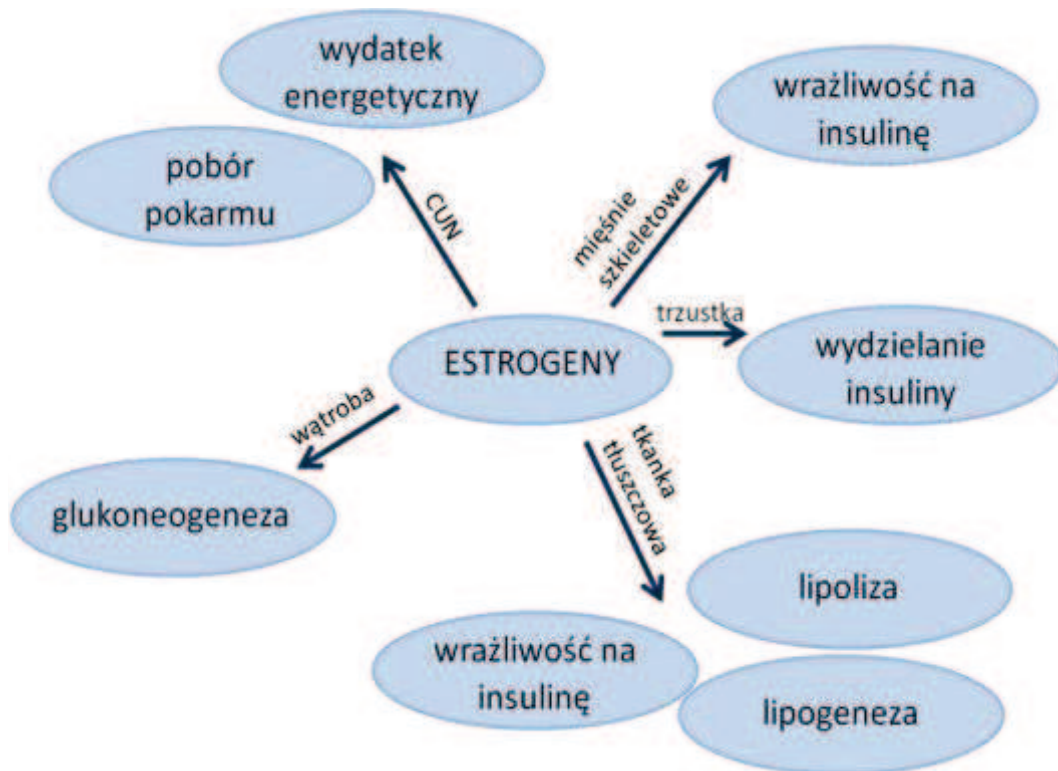
Tabela 1. Porównanie kryteriów rozpoznania ZM proponowanych przez różne towarzystwa

WHO 1998	ATP III 2001	IDF, AHA/NHLBI 2012
Insulinooporność	Obecność co najmniej 3 z 5 kryteriów:	Obecność co najmniej 3 z 5 kryteriów:
Obecność co najmniej 2 z 5 kryteriów:	Obwód pasa >88cm K, >102cm M	Obwód pasa >80cm K, >94 M** (88 K,102 M)
Obwód pasa >80/88cm K, >94/102 cm M	Triglicerydy (TG $\geq$ 150 mg/dl)	Triglicerydy (TG $\geq$ 150 mg/dl)
SBP $\geq$ 130 mmHg lub DBP $\geq$ 85 mmHg	SBP $\geq$ 130 mmHg lub DBP $\geq$ 85 mmHg	SBP $\geq$ 130 mmHg lub DBP $\geq$ 85 mmHg
Triglicerydy (TG $\geq$ 150 mg/dl)	Glukoza we krwi na czczo $\geq$ 100 mg/dl*	Glukoza we krwi na czczo $\geq$ 100 mg/dl*
Cholesterol HDL <40 M/50 K mg/dl	Cholesterol HDL <40 M/50 K mg/dl	Cholesterol HDL <40 M/50 K mg/dl
Mikroalbuminuria	*również nieprawidłowa glikemia na czczo i DM2	*również nieprawidłowa glikemia na czczo i DM2
<u>Pacjenci z DM2 nie są wykluczani</u>	ZM zwiększa ryzyko DM2 i CVD lub przyspiesza rozwój choroby. <u>Pacjenci z DM2 nie są wykluczani</u>	**wartości są inne dla różnych grup etnicznych <u>Pacjenci z DM2 nie są wykluczani</u>



## 1.2 MENOPAUA I ESTROGENY

Grupą osób szczególnie narażonych na rozwój ZM są kobiety po menopauzie. Menopauzą nazywamy ostatnią fizjologiczną miesiączkę w życiu kobiety. Po wystąpieniu menopauzy w organizmie kobiety przestają być produkowane estrogeny, które poza swoimi funkcjami rozrodczymi wywierają także wiele korzystnych efektów metabolicznych. Wyniki szeregu badań dowodzą, że obniżają one stężenie aterogennych lipidów krwi, zwiększają wrażliwość tkanek na insulinę, zmniejszają odkładanie się trzewnej tkanki tłuszczowej oraz mają korzystny wpływ na gospodarkę węglowodanową (Gruber i wsp., 2002; Rachoń i wsp., 2007; Resanovic i wsp., 2013). Co więcej, estrogeny korzystnie wpływają na śródbłonek naczyń oraz wywierają działanie hipotensyjne (Mueck i Seeger, 2004). Spadek ilości estrogenów u kobiet po menopauzie powoduje zmniejszenie ilości podskórnej tkanki tłuszczowej i jednocześnie wzrost objętości tkanki tłuszczowej w okolicy brzucha (Liu i Shi, 2014; Toth i wsp., 2001), która wykazuje większą aktywność lipazy lipoproteinowej. W konsekwencji z tkanki tłuszczowej trzewnej uwalniane są duże ilości wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) i glicerolu, które powodują rozwój oporności tkanek na insulinę, tzn. zmniejszenie wrażliwości tkanek i narządów na insulinę. Wzrost insulinooporności powoduje wzmożoną glukoneogenezę w wątrobie i spadek wychwyty glukozy w mięśniach szkieletowych (Boden, 2011; Siemińska, 2007). Estrogeny zatem mają wpływ na lipolizę, lipogenezę, glukoneogenezę oraz ilość przyjmowanego pokarmu, (schemat nr 1) (Foryst-Ludwig i Kintscher, 2010). Nie dziwi więc fakt, że u kobiet po menopauzie obserwuje się istotny wzrost występowania nadwagi i otyłości a co za tym idzie wzrost insulinooporności tkanek, która stanowi ważny czynnik ryzyka rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego i leży u podstaw patogenezy ZM (Lizcano i Guzmán, 2014; Mauvais-Jarvis, 2011; Wietlisbach i wsp., 2013).



Rycina 1. Metaboliczne właściwości estrogenów

### 1.3 MOLEKULARNE MECHANIZMY ODDZIAŁYWANIA ESTROGENÓW

Estrogeny oddziałują na tkanki docelowe poprzez swoje receptory (*estrogen receptors - ER*). ER należą do rodziny receptorów jądrowych o właściwościach czynników transkrypcyjnych. W ich budowie wyróżnić można kilka miejsc aktywnych: domenę wiążącą DNA (z ang. *DNA – binding domain – DBD*) o charakterystycznej budowie określanej jako palce cynkowe, domenę wiążącą ligand (z ang. *ligand binding domain - LBD*) oraz regiony aktywujące i regulujące. Gdy ER nie są związane z ligandem asocjują z białkami opiekuńczymi, dzięki czemu DBD jest zasłonięta. Znane są dwa typy ER: ER $\alpha$  i ER $\beta$ . DBD wykazuje duże podobieństwo w przypadku obu receptorów (95 % homologii), natomiast LBD receptorów istotnie się różni (30 % homologii) (Zhao i wsp., 2008). W konsekwencji niektóre ligandy wykazują różne powinowactwo do ER. Ligandem, który wiąże się najsilniej zarówno z ER $\alpha$  jak i ER $\beta$  jest 17 $\beta$ -estradiol (E2) (Gruber i wsp., 2002). Połączenie jądrowych (wewnątrzcytoplazmatycznych) ER ze swoistymi ligandami prowadzi do ich dimeryzacji (homo- i heterodimeryzacji). Kompleksy te następnie tworzą czynniki transkrypcyjne, które łączą się

z określonym rejonem DNA tzw. rejonem ERE (z ang. *estrogen response element*), co skutkuje aktywacją lub wyciszeniem ekspresji danego genu. Sygnalizacja na drodze klasycznej trwa zazwyczaj kilka godzin (Foryst-Ludwig i Kintscher, 2010; Lizcano i Guzmán, 2014). Istnieje także inny mechanizm oddziaływania estrogenów na komórki poprzez tak zwane receptory związane z białkiem G30 (z ang. *G protein-coupled receptor, GPR30*) obecne w błonie komórkowej. Ich budowa strukturalna różni się od budowy klasycznych ER (Revankar i wsp., 2005; Thomas i wsp., 2005). Droga niegenomowa jest również określana jako szybka, gdyż trwa zazwyczaj sekundy lub minuty i prowadzi do uwolnienia tlenu azotu (NO) i jonów wapniowych (Ca<sup>2+</sup>), co skutkuje aktywacją kinaz Ras/Raf/Mek/Erk (Banerjee i wsp., 2014; Foryst-Ludwig i Kintscher, 2010)

Gen kodujący ludzkie ER $\alpha$  położony jest na długim ramieniu chromosomu 6 (locus: 6q25.1) (Menasce i wsp., 1993), natomiast gen kodujący ludzkie ER $\beta$  zlokalizowano na długim ramieniu chromosomu 14 (locus: 14q23-24) (Ge i wsp., 2014). Jest on jednym z genów należących do tak zwanej Genetycznej Mapy Otyłości u Ludzi (z ang. *Human Obesity Gene Map*) (Rankinen i wsp., 2006). Wiadomo, że geny kodujące ER mogą różnić się sekwencją pod względem pojedynczych nukleotydów. Obecnie znanych jest kilkadziesiąt polimorfizmów genów ER. Niektóre z nich mogą wpływać zarówno na ekspresję jak i wrażliwość ER w obrębie określonych tkanek i narządów. Nie dziwi więc fakt, że wykazano istnienie związku pomiędzy występowaniem określonych polimorfizmów genów ER a rozwojem różnych chorób u kobiet po menopauzie np. raka sutka (Javed i wsp., 2011; Shin i wsp., 2003), raka endometrium (Weiderpass i wsp., 2000), raka jajnika (Schüler i wsp., 2014), osteoporozy (Binh i wsp., 2006; Nam i wsp., 2005; Tsai i wsp., 2003) oraz depresji (Kim i wsp., 2010).

#### **1.4 PODSUMOWANIE I ZNACZENIE BADANIA**

W ciągu najbliższych dziesięcioleci, ze względu na wydłużenie średniego czasu życia, liczba kobiet po menopauzie drastycznie wzrośnie (Rachoń i wsp., 2004). Ponadto wydłużenie wieku emerytalnego w Polsce sprawiło, że kobiety po menopauzie pozostają aktywne zawodowo przez okres co najmniej 15 lat po jej wystąpieniu. Dlatego poznanie zarówno środowiskowych jak i genetycznych

czynników predysponujących do rozwoju ZM może stanowić istotny element prewencji T2DM oraz chorób układu sercowo-naczyniowego w tej populacji. Dlatego też, celem mojej pracy jest ocena związku pomiędzy występowaniem określonych polimorfizmów genów ER ( $ER\alpha$  i  $ER\beta$ ) a rozwojem i występowaniem poszczególnych składowych ZM u kobiet po menopauzie.

Ponadto dzięki zastosowaniu innowacyjnej metody genotypowania wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań mogą stanowić podstawę identyfikacji potencjalnego markera molekularnego (określone allele genu ER) predysponującego do rozwoju ZM wśród kobiet po menopauzie. Znalezienie takiej zależności może przyczynić się do wdrożenia wczesnej profilaktyki rozwoju ZM, a co za tym idzie zmniejszyć zachorowalność na T2DM i ChNS, która stanowi główną przyczynę zgonów kobiet po menopauzie.

## 2. CEL PRACY

Celem mojej pracy było znalezienie odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy posiadanie określonych genotypów w miejscach polimorficznych genów kodujących ER $\alpha$  i ER $\beta$  może predysponować do rozwoju ZM u kobiet po menopauzie?
2. Czy istnieje związek pomiędzy posiadaniem określonych genotypów w miejscach polimorficznych genów kodujących ER a występowaniem poszczególnych składowych ZM?

*Hipoteza badawcza:*

*Posiadanie określonych alleli w obrębie genów kodujących ER może mieć związek z występowaniem ZM i jego składowych u kobiet po menopauzie.*

### **3. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE**

#### **3.1 MATERIAŁ BADAWCZY**

W badaniu wzięło udział 147 kobiet po menopauzie. Menopauza definiowana była jako brak miesiączki przez co najmniej 12 miesięcy, po wykluczeniu innych potencjalnych przyczyn tego stanu. Wszystkie pacjentki były mieszkankami województwa pomorskiego i zostały zachęcane do wzięcia udziału w badaniu przez ogłoszenia w internecie. Spotkania z pacjentkami odbywały się w gabinecie konsultacyjnym Zakładu Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej w Instytucie Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego przy ul. Powstania Styczniowego 9B w Gdyni, gdzie były również konsultowane przez internistę-endokrynologa prof. dr. n. med. Dominika Rachonia. Uczestniczki zostały poinformowane o założeniach badania i wyraziły pisemną zgodę na wzięcie w nim udziału (wzór dokumentu z informacją o badaniu i pisemną zgodą pacjentki oraz formularz badania załączyłam w Aneksie niniejszej rozprawy). Z każdą z uczestniczek badania przeprowadziłam dokładny wywiad medyczny obejmujący między innymi pytania o wiek pierwszej (PM) i ostatniej miesiączki (OM) oraz choroby przewlekłe i przyjmowane leki. W trakcie wizyty dokonałam pomiaru masy i składu ciała (zawartość całkowitej tkanki tłuszczowej i tkanki mięśniowej), pomiaru ciśnienia tętniczego krwi oraz obwodu pasa. Następnie od każdej z pacjentek została pobrana krew żylna do próbek niezawierających antykoagulantu („na skrzep”) celem oznaczeń stężenia glukozy, lipidów (cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL, cholesterolu HDL, triglicerydów), insuliny oraz białka C-reaktywnego (CRP) i adiponektyny. Do drugiej próbki pobrano krew żylną na EDTA, która została zamrożona w temperaturze - 70°C celem izolacji DNA i identyfikacji wybranych polimorfizmów genów ER. Badanie uzyskało zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKEBN/11/2011), której kopię załączyłam w Aneksie niniejszej rozprawy.

## **3.2 METODY BADAWCZE**

### *3.2.1 Analiza składu ciała*

U każdej z pacjentek przeprowadziłam analizę składu ciała przy użyciu analizatora firmy TANITA, model BC 418 MA. Badanie wykorzystuje metodę bioimpedancji elektrycznej, która opiera się na zasadzie pomiaru różnicy w przewodnictwie elektrycznym tkanek różniących się stopniem uwodnienia. Tkanka mięśniowa, kości i woda przewodzą elektryczność znacznie lepiej niż tkanka tłuszczowa. Dzięki temu metoda ta pozwala na nieinwazyjne i względnie wiarygodne oszacowanie składu ciała. Wynik badania podaje następujące parametry: masę ciała (kg), zawartość całkowitej tkanki tłuszczowej (%), masę całkowitej tkanki tłuszczowej (kg), ilość beztłuszczowej masy ciała (kg), masę tkanki mięśniowej (kg), zawartość wody (%), masę wody (kg), masę kości (kg).

### *3.2.2 Pomiar obwodu pasa*

Obwód pasa był mierzony na wysokości grzebienia biodrowego na gołej skórze, przy użyciu nierozciągliwej taśmy centymetrowej ułożonej prostopadle do długiej osi ciała, równoległe do podłogi.

### *3.2.3 Pomiar ciśnienia tętniczego*

Ciężnienie tętnicze krwi było mierzone w pozycji siedzącej po kilkuminutowym odpoczynku, najczęściej pod koniec trwania wizyty. Pomiaru ciśnienia tętniczego krwi dokonywałam trzykrotnie przy użyciu aparatu oscylometrycznego do mierzenia ciśnienia firmy OMRON M3. Do analizy badania przyjmowałam średnią wartość z trzech pomiarów.

### *3.2.4 Pobieranie krwi żyłnej*

Od każdej z pacjentek pobrano na czczo z żyły łokciowej 10 ml krwi systemem próżniowym do probówek niezawierających antykoagulantu („na skrzep”) oraz 5 ml

krwi do probówek zawierających EDTA. Pobrania krwi oraz badania profilu lipidowego, poziomów glukozy, insuliny i CRP dokonywano w Laboratorium Medycznym Bruss przy ul. Powstania Styczniowego 9B w Gdyni.

### *3.2.5 Uzyskiwanie surowic*

Krew pobraną na skrzep wirowałam przez 15 minut przy prędkości 2500 obrotów/min, następnie surowicę zbierałam i rozdzielałam po 500 µl do probówek typu Eppendorf o pojemności 1.5 ml. Materiał przechowywałam w temperaturze - 70°C w celu przeprowadzenia dalszych oznaczeń.

### *3.2.6 Izolacja materiału genetycznego*

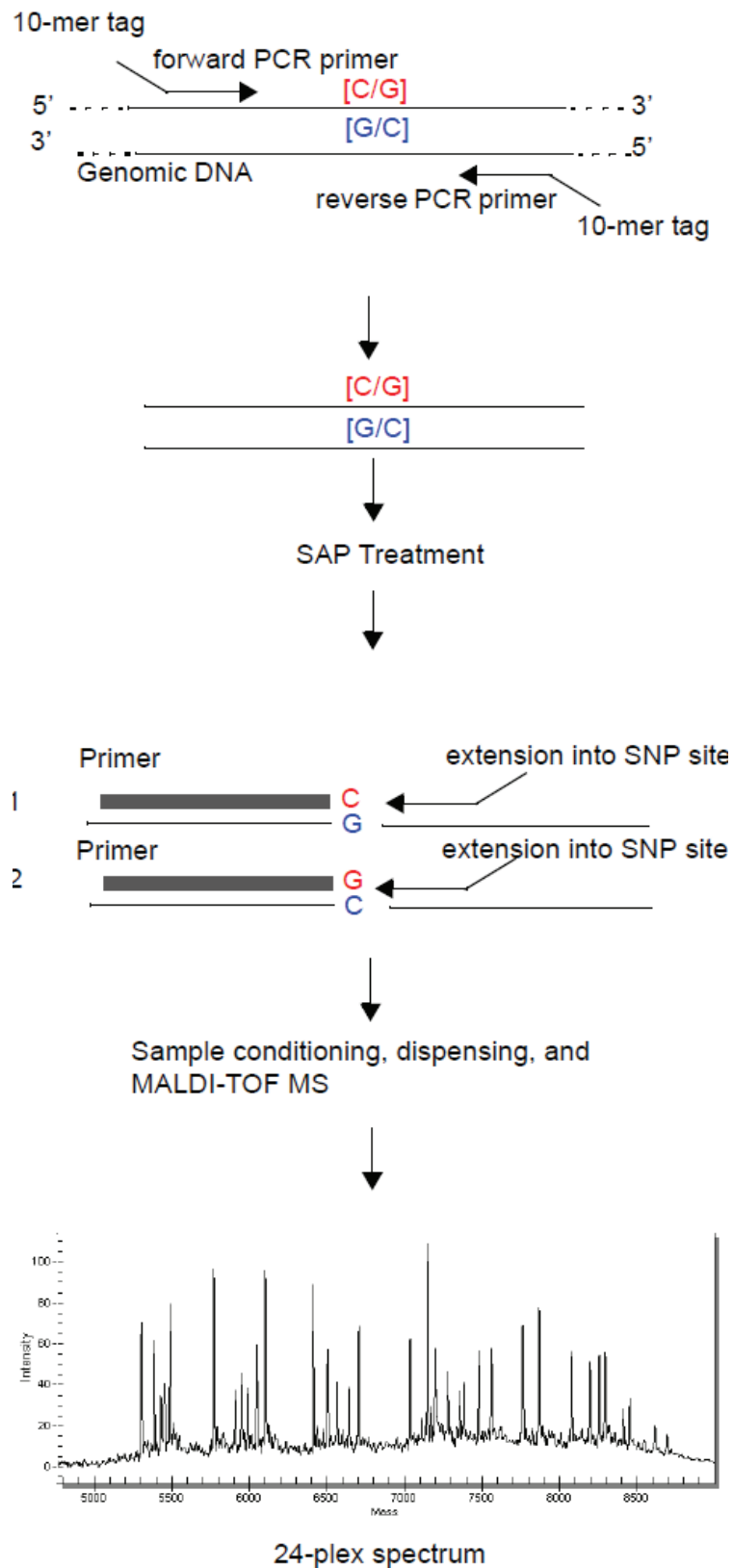
Genomowy DNA izolowałam z 1 ml krwi żyłnej pobranej do probówki zawierającej EDTA z wykorzystaniem komercyjnego zestawu „Blood Mini” (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Do 1 ml krwi w probówce typu Eppendorf o pojemności 2 ml dodawałam 500 µl roztworu lizującego erytrocyty (LE), mieszałam przez kilkukrotne odwrócenie probówki, a następnie wirowałam przy prędkości 12 000 obrotów/min. W kolejnym etapie zlewałam nadsącz, a do osadu leukocytów dodawałam 100 µl buforu Tris, 200 µl buforu lizującego LT (bufor zawierający sole chaotropowe i detergenty niejonowe) i 20 µl proteiny K w celu przeprowadzenia lizy komórek i degradacji białek. Próbkę inkubowałam 20 minut w termobloku o temperaturze 37 °C. Następnie próbkę przez 20 sekund poddawałam intensywnemu wstrząsaniu, nanosiłam na „mini kolumnę do oczyszczania genomowego DNA” zawierającą specjalne złożo krzemionkowe, które wiąże DNA i ułatwia usuwanie zanieczyszczeń z materiału. Kolumny z nałożonymi próbkami wirowałam przez minutę przy prędkości 12 000 obrotów/min. W dalszej kolejności dodawałam dwukrotnie, w celu wypłukania zanieczyszczeń, roztwór płuczący A1 (500 µl i 400 µl) i wirowałam przy prędkości 12 000 obrotów/min przez 1 minutę. Minikolumny przenosiłam do nowej probówki typu Eppendorf o pojemności 1.5 ml, dodawałam 200 µl buforu Tris (10mM Tris-HCl, pH=8.5) w celu elucji materiału genetycznego ze złoża i inkubowałam przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próbkę wirowałam przez minutę przy



prędkości 12 000 obrotów/min. Oczyszczone DNA przechowywałam do dalszych analiz w temperaturze - 20°C.

### *3.2.7 Analiza wybranych polimorfizmów genów kodujących ER przy użyciu platformy Sequenom MassARRAY*

Analiza wybranych polimorfizmów w obrębie genów kodujących ER $\alpha$  i ER $\beta$  została wykonana przy użyciu aparatury MassARRAY firmy Agena Biosciences udostępnionej przez Zakład Diagnostyki Molekularnej Katedry Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, którego kierownikiem jest prof. dr hab. Krzysztof Bielawski. System MassARRAY opatentowany przez firmę Agena Biosciences (dawniej SEQUENOM) jest platformą do analizy DNA i RNA wykorzystującą wysokowydajną technologię spektrometrii mas opartą na pomiarze czasu przelotu jonów (TOF MS, z ang. *Time Of Flight Mass Spectrometry*). System pozwala na skuteczne i precyzyjne pomiary ilości materiału genetycznego i jego zmienności. Badanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu z wykorzystaniem platformy MassARRAY składa się z reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, z ang. *Polimerase Chain Reaction*) i reakcji wydłużenia startera o jeden nukleotyd (tzw. reakcja iPLEX) wraz z detekcją polimorfizmów na spektrometrze mas typu MALDI-TOF. Schematyczny przebieg badania przedstawia Rycina 2. Badania polimorfizmów przeprowadzone w ramach niniejszej pracy prowadzone były w oparciu o kompletny zestaw odczynników iPLEX Gold, dostarczonych przez firmę Agena Biosciences.



Rycina 2. Schematyczny przebieg badania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu z wykorzystaniem platformy MassARRAY (źródło: materiały informacyjne firmy Agena Biosciences)

Tabela 2. Sekwencje starterów użytych do powielenia w drodze PCR wybranych fragmentów genów kodujących ER $\alpha$  i ER $\beta$

Nazwa polimorfizmu	Starter przedni	Starter wsteczny
rs2175898	ACGTTGGATGCTTCACAGTTTGCAAAGCTC	ACGTTGGATGAGCATGGCATGTGTCAACAG
rs1256049	ACGTTGGATGTAACACCTCCATCCAACAGC	ACGTTGGATGTCTCACCGCCTCTTGCTTTC
rs12664989	ACGTTGGATGCCAAGAGAAATTGTGTCAGG	ACGTTGGATGACAGGCTTTCCTCTGCTATG
rs7774230	ACGTTGGATGAACATGAATGTCCATCTGGC	ACGTTGGATGTTCCACTAGCTGGATCTCTG
rs1709183	ACGTTGGATGAGTGTAAGGCAGGACAAGAC	ACGTTGGATGGATGAAATGCACAGTCCAAC
rs4986938	ACGTTGGATGTGAGGTGAACTGGCCACA	ACGTTGGATGACAGCAGAAAGATGAAGCCC
rs9322331	ACGTTGGATGAGAAGGCCTCGTGTAGACTG	ACGTTGGATGCCTCTAGTTTCCTTCTTGGC
rs944050	ACGTTGGATGTAGACTGGCTCTGAGCAAAG	ACGTTGGATGTTGAGCAGATGTTCCATGCC
rs9340799	ACGTTGGATGTTAGAGACCAATGCTCATCC	ACGTTGGATGCATCAGTTCATCTGAGTTCC
rs1255998	ACGTTGGATGCAGTTCCTAACCTGCATCTG	ACGTTGGATGTTCCCTGAGGTTTGTGCT
rs2234693	ACGTTGGATGTTAGAGACCAATGCTCATCC	ACGTTGGATGCATCAGTTCATCTGAGTTCC
rs2987983	ACGTTGGATGTGTGGTCACAATTCAGGTAG	ACGTTGGATGCCAGAGATGGAACTTTGC
rs1709181	ACGTTGGATGAGCTACTGACAACAGTTCTC	ACGTTGGATGCATGGTTCGTGGCCTAATTC
rs6902771	ACGTTGGATGTGGAAATTGTGGTAAGTGCC	ACGTTGGATGCCCTCATCAAATCAAGTCCC
rs1887944	ACGTTGGATGGTGTATTGTTCTGTTTTCCC	ACGTTGGATGGGAAAGCTGCTAGAGTTTAC
rs712221	ACGTTGGATGAGGCATGCTATCTTGCATAC	ACGTTGGATGGGAAGGGTCAGAAAAACAGG
rs3020450	ACGTTGGATGTCAACCTAACCTTGTGGCTG	ACGTTGGATGGTGCCTAGTTTCCTTGTGT
rs3020449	ACGTTGGATGGATCAGTAGTCTTCAGGAAC	ACGTTGGATGACTCCGGTTGGTCTTAATGC
rs827417	ACGTTGGATGAGGTAATGAGCATAGTACCC	ACGTTGGATGTGCATTGAGCCGAGATCAAG

Reakcja PCR zachodzi standardowo w trzech etapach. W pierwszym etapie dochodzi do wstępnej denaturacji genomowego DNA. W drugim etapie następuje wielokrotne powielenie badanego fragmentu DNA, obejmujące procesy właściwej denaturacji (rozplecenia nici) w temp. 94 °C, przyłączania starterów w temp. 56 °C do nici matrycowych oraz wydłużenia nowo powstałych nici przez polimerazę DNA w temp. 72 °C. Sekwencje starterów do reakcji PCR przedstawiłam w Tabeli 2. Trzeci etap obejmuje końcowe wydłużanie nici w temperaturze 72°C. Następnie materiał pozostaje w temperaturze 4°C. Etapy reakcji przedstawiłam w Tabeli 3. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela 4.

Tabela 3. Etapy PCR

Etapy reakcji	Temperatura	Czas trwania procesów
I ETAP	95°C	2 min.
II ETAP (obejmuje 45 cykli)	95°C 56°C 72°C	30 sek 30 sek 1 min.
III ETAP	72°C	5 min.
koniec reakcji	4°C	....

Po PCR przy użyciu mieszaniny SAP (ang. Shrimp Alkaline Phosphatase) zawierającej alkaliczną fosfatazę usuwane są wszystkie pozostałe po reakcji wolne deoksynukleotydy mogące mieć wpływ na dalszy etap eksperymentu. Do 5 µl uzyskanego produktu PCR dodaje się 2 µl mieszaniny SAP, delikatnie miesza probówki, następnie inkubuje w termocyklerze przez 40 minut w temperaturze 37 °C, kolejne 5 minut w temperaturze 85 °C, następnie pozostawia się próbki w temperaturze 4 °C. Skład mieszaniny SAP przedstawia Tabela 5.

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR z wykorzystaniem platformy Sequenom MassARRAY

Odczynnik	Stężenie w 5 $\mu$ L	Ilość potrzebna na 1 reakcję
Woda sterylna		0.80 $\mu$ L
Bufor PCR (10x)	1x	0.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2mM	0,4 $\mu$ L
Trójfosforany deoksynukleotydów (dNTP) (25mM)	500 $\mu$ M	0.100 $\mu$ L
Startery (500nM każdy) (Sigma, Niemcy)	100nM	1.000 $\mu$ L
DNA genomowe (5-10ng/ $\mu$ L)	5-10ng/rxn	2.000 $\mu$ L
Polimeraza PCR Enzyme (5U/ $\mu$ L)	1U/rxn	0.200 $\mu$ L
SUMA		5.000 $\mu$ L

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej SAP w badaniu z wykorzystaniem platformy Sequenom MassARRAY

Odczynnik	Ilość potrzebna na 1 reakcję
Woda sterylna	1.530 $\mu$ L
Bufor SAP (10x)	0.170 $\mu$ L
Enzym SAP (1,7U/ $\mu$ L)	0.300 $\mu$ L
SUMA	2.000 $\mu$ L

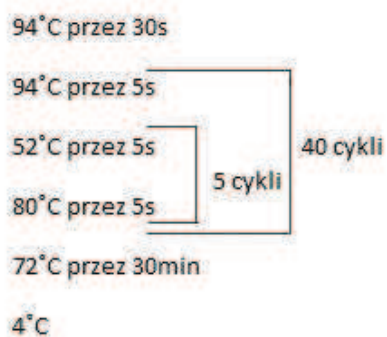
W reakcji iPLEX startery komplementarne do sekwencji DNA bezpośrednio sąsiadujących z analizowanymi miejscami polimorficznymi są wydłużane o jeden nukleotyd z wykorzystaniem dideoksynukleotydów końcowych odpowiednio zmodyfikowanych pod względem masy cząsteczkowej. Dideoksynukleotydy użyte do reakcji wydłużania przedstawia Tabela 6. Etap ten rozpoczyna się od przygotowania mieszaniny iPLEX. Skład mieszaniny przedstawia Tabela 7. Następnie próby należy wymieszać i przeprowadzić reakcję iPLEX, która składa się z 200 krótkich cykli (2 przebiegi, jeden składający się z 40 cykli, wewnątrz którego jest przebieg składający się z 5 cykli). Próbki ulegają denaturacji w 94 °C. Następuje rozplecenie nici DNA (5 sekund w 62 °C) i ich wydłużenie (5 sekund w 80 °C). Proces rozplatania i wydłużenia jest powtarzany jeszcze 4-krotnie. W dalszej kolejności ponownie następuje 5 sekundowa denaturacja w 94 °C i ponownie 5 cykli rozplatania i wydłużenia nici. Końcowe wydłużanie nici następuje w temperaturze 72 °C (3 minuty). Następnie próby są ochładzane do 4 °C. Schemat reakcji iPLEX jest przedstawiony na Rycinie 3.

Tabela 6. Dideoksynukleotydy wykorzystane do etapu wydłużania w reakcji iPLEX oraz ich stężenie użyte w reakcji. W sekwencji nukleotydów małymi literami oznaczyłam niespecyficzne zasady dodane w celu „zbilansowania masy”

Nazwa polimorfizmu	Sekwencje dideoksynukleotydów	Stężenie [uM] w mieszaninie starterów do etapu wydłużania
rs2175898	TTGCCTTCTCTCCCCG	7
rs1256049	GCTCTCCAAGAGCCGT	7
rs12664989	AGGTGGACATCAGGTAG	7
rs7774230	ctATCTGGCATTCCCCAG	7
rs1709183	GACTTCTGTTCCCTTGAT	9.3
rs4986938	gGGCCCACAGAGGTCACAG	9.3
rs9322331	gGTAGACTGAAGGGCATGG	9.3
rs944050	gaAGCACCTTTTTGTCCCCG	9.3
rs9340799	tcctATGCTCATCCCAACTCT	9.3
rs1255998	cccaaTGCATCTGTTGGCAGG	11.6
rs2234693	ACAGAGACAAAGCATAAAACG	11.6
rs2987983	CAGGTAGAATTGGAATAATCAT	11.6
rs1709181	ACTGACAACAGTTCTCTATGAAG	11.6
rs6902771	AGTATAGGGAATTTTGAGTGTAT	11.6
rs1887944	CCCTAATAAACAGAAATAATGGCG	14
rs712221	gAGAAAGGAAAAAGGAAAAGTTAT	14
rs3020450	ggatAAGAGAGCCCAGGATTTCTAT	14
rs3020449	cTTCTCAAGGAAATTTTAGCAAATCT	14
rs827417	gcGTTTTTTGTTTTCTTTGTTTTTTTT	28

Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji iPLEX z wykorzystaniem platformy Sequenom MassARRAY

Odczynnik	Stężenie w 9 $\mu$ L	Ilość potrzebna na 1 reakcję
Woda sterylna		0.619 $\mu$ L
Bufor iPLEX (10x)	0.222X	0.200 $\mu$ L
Mieszanina iPLEX	1X	0.200 $\mu$ L
Mieszanina starterów do reakcji wydłużania (7 $\mu$ M, 9.3 $\mu$ M, 11.6 $\mu$ M, 14 $\mu$ M, 28 $\mu$ M)	0.73 $\mu$ M, 0.97 $\mu$ M, 1.21 $\mu$ M, 1.46 $\mu$ M, 2.92 $\mu$ M	0.940 $\mu$ L
Enzym iPLEX	1X	0.041 $\mu$ L
SUMA		2.000 $\mu$ L



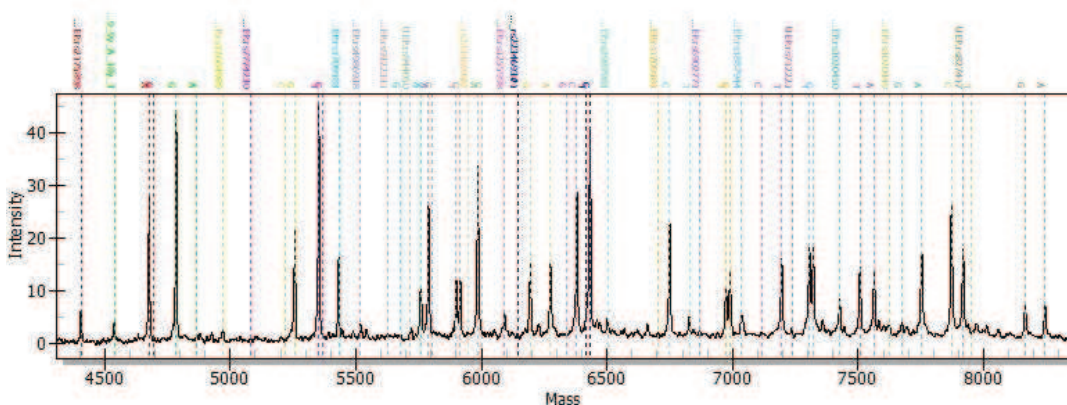
Rycina 3. Schemat reakcji iPLEX w badaniu z wykorzystaniem platformy Sequenom MassARRAY

Produkty reakcji iPLEX są oczyszczane z pozostałości soli na złożu jonowymiennym, nanoszone na czip pomiarowy SpectroCHIP z Agena Biosciences w objętościach 8-16 nl za pomocą urządzenia MassARRAY Nanodispenser RS1000 (Agena Biosciences). Pomiar widm masowych z czipu prowadzony jest w urządzeniu MassARRAY Analyzer 4 (Agena Biosciences).

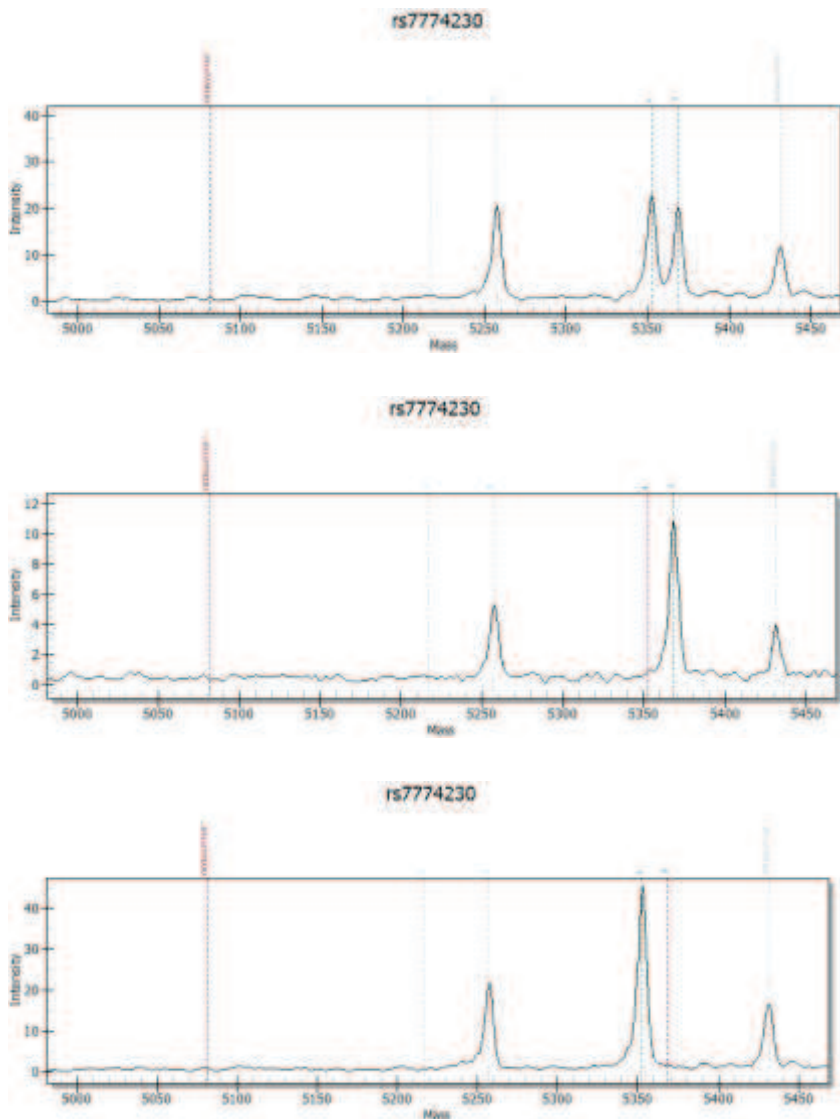


W kolejnym etapie dochodzi do desorpcji laserowej matrycy znajdującej się na czipie, z którą związane jest badane DNA (MALDI, z ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*). Następnie działa analizator czasu przelotu (TOF, z ang. *Time of Flight Analyser*). W spektrometrze do analizatora wprowadzana jest wiązka jonów. Jony charakteryzują się różnymi stosunkami masy do ładunku, w związku z czym poruszają się z różną prędkością (czym większy jest stosunek masy do ładunku tym wolniej poruszają się analizowane jony) i po przebyciu pewnej drogi w przestrzeni docierają do detektora z opóźnieniem zależnym od tej prędkości. Następnie odpowiedni układ elektroniczny przelicza zmierzony czas przelotu na stosunek masy do ładunku identyfikując masę danego fragmentu w czasie rzeczywistym.

Analizę uzyskanych widm masowych prowadziłam z wykorzystaniem oprogramowania Typer 4 (Agena Biosciences), co pozwoliło na określenie genotypów analizowanych *loci*. Rycina 4 przedstawia przykładowy obraz widma dla wszystkich 19 polimorfizmów, natomiast Rycina 5 przedstawia wybrany polimorfizm w trzech wariantach genotypowych.



Rycina 4. Przykładowy obraz widma dla 19 wybranych polimorfizmów



Rycina 5. Polimorfizm rs7774230 w wariantach genotypowych: CT, C oraz T

### 3.2.8 Pomiar stężenia adiponektyny w surowicy badanych kobiet

Stężenie adiponektyny w surowicy pacjentek było mierzone z wykorzystaniem komercyjnego zestawu immunoenzymatycznego (ELISA) (R&D Systems). Test opiera się na wykorzystaniu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw domenie globularnej adiponektyny. Na opłaszczoną przeciwciałami 96-dołkową płytkę nakłada się w podwójnych powtórzeniach standardy zawierające znane ilości rekombinowanego białka w ilości kolejno: 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62.5 ng/ml, 31.2 ng/ml, 15.6 ng/ml, 7.8 ng/ml, 3.9 ng/ml, „standard zerowy” oraz analizowane próbki surowicy rozcieńczone w stosunku 1:100. Płytkę inkubuje się 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie trzykrotnie płucze dołki uprzednio

przygotowanym „buforem płuczącym”. Następnie na płytkę dodaje się 200 µl przeciwciał monoklonalnych i inkubuje kolejne 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie po raz kolejny trzykrotnie płucze się „buforem płuczającym” i dodaje po 200 µl substratu dla enzymu. Po 30-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej dodaje się po 50 µl roztworu zatrzymującego reakcję enzymatyczną i mierzy wartość absorbancji w czytniku płytek przy długości fali równej 450 nm. Krzywą wzorcową dla użytych stężeń standardów oraz analizę danych (przeliczenie zmierzonych wartości absorbancji na stężenie białka z uwzględnieniem wyjściowego rozcieńczenia surowicy) przeprowadza się przy użyciu oprogramowania dołączonego do czytnika absorbancji płytek 96-dołkowych.

### *3.2.9 Analiza objawów wypadowych przy użyciu polskiej wersji formularza MRS (z ang. Menopause Range Scale)*

Formularz MRS (dołączony do Aneksu niniejszej rozprawy) jest używany w celu uzyskania subiektywnej oceny natężenia objawów hipiestrogenemii pomenopauzalnej („objawów wypadowych”). Wypełnienie go polega na zaznaczeniu czy dany objaw występuje i jak bardzo jest nasilony (0 – brak, 1 – stopniu łagodnym, 2 – umiarkowanym, 3 – poważnym, 4 – bardzo poważnym). Ocenia się trzy rodzaje objawów: psychologiczne (0-16 punktów), somatyczne (0-16 punktów) oraz związane z układem moczowo-płciowym (0-12 punktów). W sumie można uzyskać od 0 do 44 punktów. Im wyższy wynik końcowy, tym większe nasilenie objawów wypadowych (hipiestrogenemii).

### *3.2.10 Analiza statystyczna wyników*

Do analizy statystycznej uzyskanych wyników posłużyłam się programem STATISTICA wersja 8. Testowanie normalności rozkładu badanych zmiennych przeprowadziłam przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Zmienne spełniające założenie normalności rozkładu przedstawiłam w postaci średniej arytmetycznej oraz odchylenia standardowego (SD). Zmienne niespełniające założenia normalności rozkładu przedstawiłam w postaci mediany i rozstępu międzykwartylowego (Q1–

Q3). Przed przeprowadzeniem parametrycznych testów statystycznych zmienne niespełniające założenia normalności rozkładu poddawałam transformacji logarytmicznej. W przypadku nieuzyskania „normalizacji rozkładu” do dalszej ich analizy posłużyłam się testami nieparametrycznymi.

Zastosowałam następujące testy:

- porównywanie dwóch grup zmiennych niezależnych: test t-studenta dla prób niezależnych lub jego „nieparametryczny odpowiednik” test U Manna-Whitneya;
- porównywanie trzech grup zmiennych niezależnych: test analizy wariancji (ANOVA) lub jego odpowiednik: test Kruskala-Wallisa. W przypadku wykazania różnic w obrębie testu ANOVA: test post-hoc NIR (najmniejszych istotnych różnic). W przypadku wykazania różnic w obrębie testu Kruskala-Wallisa: test U Manna-Whitneya z poprawką Bonferroniego;
- korelowanie zmiennych: test korelacji Pearsona lub jego „nieparametryczny odpowiednik” test korelacji Spearmana;
- porównanie częstości występowania określonej cechy w niezależnych grupach: test chi-kwadrat;
- obliczenie ilorazu szans (OR) oraz 95% przedział ufności (95%CI): test regresji logistycznej.

We wszystkich analizach za znamienne statystycznie przyjął wartość  $P < 0.05$ .

## 4. WYNIKI

### 4.1 CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA ZM I JEGO SKŁADOWYCH WŚRÓD BADANYCH KOBIET

#### 4.1.1 Charakterystyka badanych kobiet

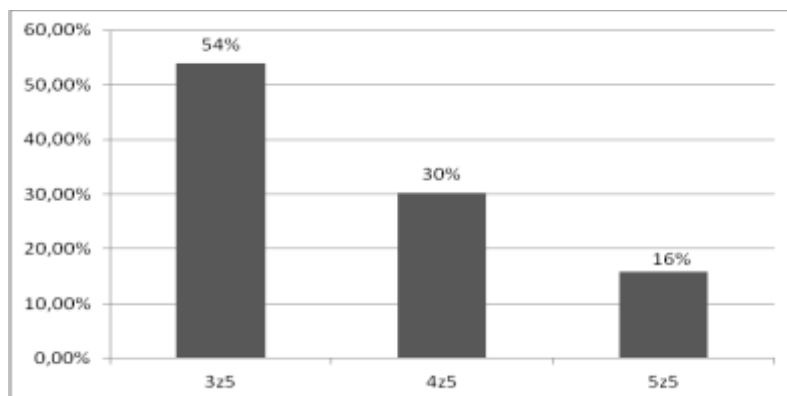
Średni wiek uczestniczek badania wynosił  $57 \pm 6$  lat (mediana: 57 lat; min-max: 47 – 80 lat). Średnia masa ciała wszystkich badanych kobiet wynosiła  $72 \pm 11.9$  kg (mediana: 69.6 kg; min-max: 49.8 – 121.7 kg), a średnia wartość BMI całej badanej populacji wyniosła  $27.0 \pm 4.3$  (mediana: 26.4; min-max: 19.1 – 38.9). Niecałe czterdzieści procent kobiet (36 %, n=53) miało prawidłowy wskaźnik masy ciała (BMI 18.5 – 24.9), 43 % (n=64) miało nadwagę (BMI 25 – 29.9), a 20 % (n=30) otyłość (BMI>30). Większość badanych kobiet (88 %, n=129) miała otyłość brzuszna definiowaną jako obwód pasa  $\geq 80$  cm. Charakterystykę badanej grupy przedstawia Tabela 8.

Tabela 8. Charakterystyka badanych kobiet (n=147)

	Wartość średnia $\pm$ SD	Mediana (Q1 – Q3)
Wiek (lata)	$58 \pm 6$	57 (53 – 62)
Wiek menopauzy (lata)	$50 \pm 3$	50 (48 – 52)
Masa ciała (kg)	$72.0 \pm 11.9$	69.6 (63.4 – 78.2)
Obwód pasa (cm)	$94.8 \pm 10.9$	93.0 (87.0 – 100.5)
BMI	$27.0 \pm 4.3$	26.4 (23.9 – 29.3)

#### 4.1.2 Częstość występowania ZM w badanej grupie kobiet

Ponad połowa badanych kobiet (52 %, n=76) spełniała kryteria rozpoznania ZM. Ponad połowa z nich (54 %, n=41) spełniała 3 z 5 kryteriów, 30 % (n=23) cztery, a 16 % (n=12) wszystkie pięć. Wyniki te przedstawia Wykres 1. Charakterystykę kobiet z rozpoznaniem ZM oraz tych, które nie spełniały kryteriów jego rozpoznania prezentuje Tabela 9.



Wykres 1. Ilość składowych ZM wśród kobiet spełniających jego kryteria (n=76)

Tabela 9. Charakterystyka kliniczna kobiet spełniających i niespełniających kryteriów rozpoznania ZM

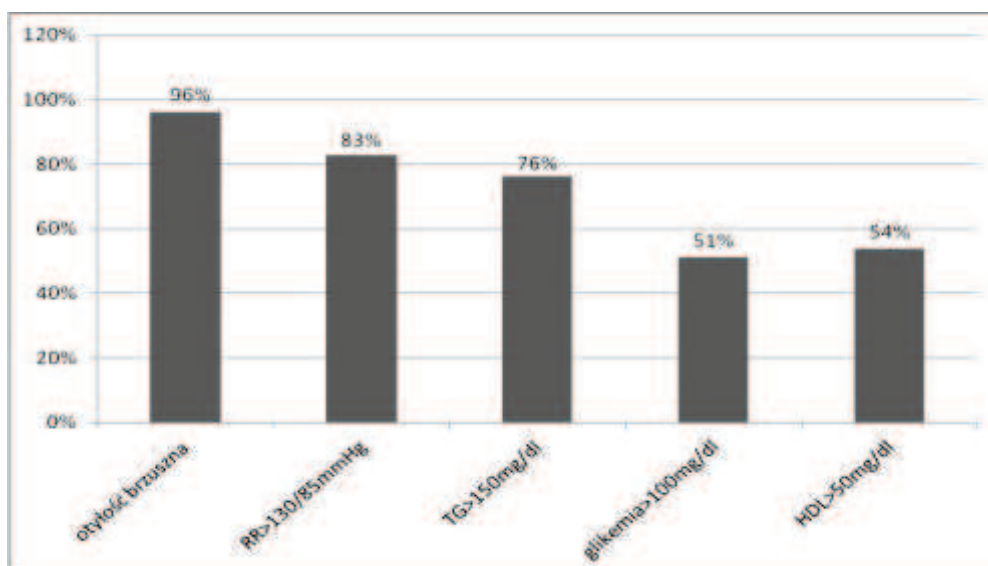
	Kobiety spełniające kryteria rozpoznania ZM N=76	Kobiety niespełniające kryteriów rozpoznania ZM N=71	Wartość P
Wiek (lata)	58 (53 - 63)	57 (53.5 - 61)	0.644
Masa ciała (kg)	71.4 (65.9 – 81.35)	67.6 (62.4 – 76.8)	0.005
Obwód pasa (cm)	97 (89 – 103.5)	92 (84.5 – 97)	0.001
BMI	27.3 (24.8 – 31.2)	25.4 (23 – 28.3)	<0.001
Cholesterol całkowity (mg/dl)	211 (184 – 245)	220 (202 – 247)	0.295
Cholesterol LDL (mg/dl)	127 (103 – 159)	135 (115 – 161)	0.444
Cholesterol HDL (mg/dl)	55 (49 – 64)	66 (58 – 81)	<0.001
Triglicerydy (mg/dl)	132 (107 – 163)	90 (70 – 115)	<0.001
Glikemia (mg/dl)	99 (93 – 106)	94 (88 – 97.5)	<0.001
SBP (mmHg)	136 ± 14	123 ± 13	<0.001
DBP (mmHg)	80 ± 9	77 ± 9	0.041

SBP – skurczowe ciśnienie tętnicze, DBP – rozkurczowe ciśnienie tętnicze

Założenie normalności rozkładu oceniano testem Shapiro-Wilka. Zmienne spełniające założenie normalności rozkładu przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej ± SD. Zmienne niespełniające założenia normalności rozkładu przedstawiono jako medianę oraz rozstęp międzykwartyłowy (Q1 – Q3).

#### 4.1.3 Częstość występowania poszczególnych składowych ZM u kobiet spełniających i niespełniających jego kryteriów

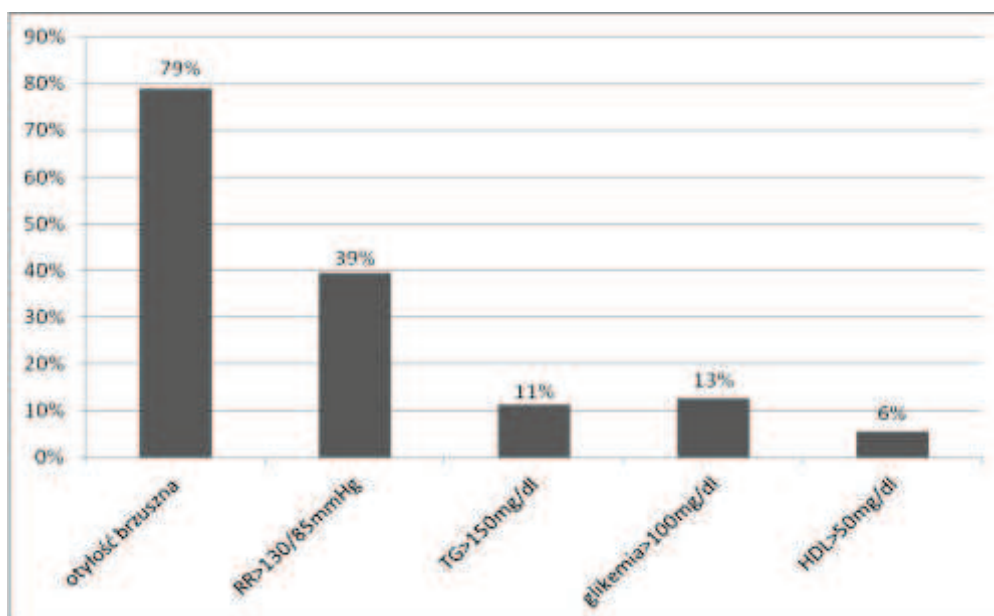
W grupie kobiet, które spełniały kryteria rozpoznania ZM prawie wszystkie badane (96 %, n=73) miały otyłość brzuszna definiowaną jako obwód pasa  $\geq 80$  cm. Ponad osiemdziesiąt procent z nich (83 %, n=63) miało podwyższone ciśnienie tętnicze krwi (SBP  $\geq 135$  lub/i DBP  $\geq 85$  mmHg) lub przyjmowało leki hipotensyjne. Trzy czwarte kobiet (76 %, n=58) miało podwyższone stężenie triglicerydów w surowicy krwi, a ponad połowa (54 %, n=41) obniżone stężenie cholesterolu HDL. Ponad połowa pacjentek z ZM (51 %, n=39) miała nieprawidłowy poziom glikemii na czczo ( $\geq 100$  mg/dl) lub przyjmowała metforminę (n=6). U trzech z spośród badanych kobiet poziom glikemii na czczo  $\geq 126$  mg/dl doprowadził do rozpoznania u nich T2DM. Częstość występowania poszczególnych składowych ZM w grupie kobiet spełniających kryteria jego rozpoznania przedstawia Wykres 2.



Wykres 2. Występowanie składowych ZM w grupie kobiet spełniających kryteria jego rozpoznania (n=76)

Niemniej jednak, w grupie kobiet niespełniających kryteriów rozpoznania ZM, 79 % (n=56) z nich miało także otyłość brzuszna, 39 % (n=28) podwyższone ciśnienie tętnicze krwi lub przyjmowało leki hipotensyjne, a 11 % (n=8)

podwyższone stężenie triglicerydów w surowicy krwi. Trzynastę procent kobiet niespełniających kryteriów rozpoznania ZM (n=9), miało także podwyższony poziom glikemii na czczo, a 6 % (n=4) charakteryzowało się obniżonym stężeniem cholesterolu HDL w surowicy krwi. Częstość występowania pojedynczych składowych ZM w grupie kobiet niespełniających kryteriów rozpoznania ZM przedstawia Wykres 3.



Wykres 3. Występowanie pojedynczych składowych ZM w grupie kobiet niespełniających kryteriów jego rozpoznania (n=71)

## 4.2 OCENA WPLYWU POSIADANIA OKREŚLONYCH ALLELI W MIEJSCACH POLIMORFICZNYCH GENÓW KODUJĄCYCH ER NA WYSTĘPOWANIE ZM I JEGO SKŁADOWYCH W BADANEJ GRUPIE KOBIET

### 4.2.1 Częstość występowania poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów genów kodujących $ER\alpha$ i $ER\beta$

Rozkład prawie wszystkich zbadanych przeze mnie genotypów był zgodny z prawem Hardego-Weinberga z wyjątkiem polimorfizmu rs9322331 genu  $ER\alpha$ , co prawdopodobnie ma związek z niewielką ilością homozygot TT (Tabele 10 i 11).



Polimorfizm rs12664989 genu ER $\alpha$  w badanej przez mnie populacji okazał się być monomorficzny i został wyłączony z dalszych analiz.

Tabela 10. Występowanie określonych alleli analizowanych polimorfizmów genu ER $\alpha$  w badanej populacji

Nazwy polimorfizmów genu kodującego ER $\alpha$	Częstość występowanie określonych genotypów w badanej populacji			Wartość P testu chi <sup>2</sup>
	TT	TC	CC	
rs2234693 T>C	TT: 30.9% (n=42)	TC: 50.7% (n=69)	CC: 18.4% (n=25)	0.919
rs9340799 A>G	AA: 44.1% (n=60)	AG: 47.1% (n=64)	GG: 8.8% (n=12)	0.681
rs1709181 T>C	TT: 39% (n=53)	TC: 43.4% (n=59)	CC: 17.6% (n=24)	0.570
rs1709183 A>G	AA: 56% (n=71)	AG: 38.6% (n=49)	GG: 5.5% (n=7)	0.928
rs2175898 A>G	AA: 64.9% (n=87)	AG: 32.8% (n=44)	GG: 2.2% (n=3)	0.639
rs6902771 C>T	CC: 30.9% (n=42)	CT: 50.7% (n=69)	TT: 18.4% (n=25)	0.938
rs712221 A>T	AA: 39% (n=53)	AT: 42.6% (n=58)	TT: 18.4% (n=25)	0.444
rs7774230 C>T	CC: 30.9% (n=42)	CT: 50.7% (n=69)	TT: 18.4% (n=25)	0.938
rs827417 A>G	AA: 42.1% (n=56)	AG: 40.6% (n=54)	GG: 17.3% (n=23)	0.300
rs9322331 C>T	CC: 47.4% (n=64)	CT: 51.1% (n=69)	TT: 1.5% (n=2)	0.003
rs12664989 G>C	GG: 100% (n=139)	GC: 0% (n=0)	CC: 0% (n=0)	-

Tabela 11. Występowanie określonych alleli analizowanych polimorfizmów genu ER $\beta$  w badanej populacji

Nazwy polimorfizmów genu kodującego ER $\beta$	Częstość występowanie określonych genotypów w badanej populacji			Wartość P testu chi <sup>2</sup>
	GG	GA	AA	
rs1256049 G>A	GG: 86.8% (n=118)	GA: 12.5% (n=17)	AA: 0.7% (n=1)	0.904
rs4986938 G>A	GG: 41.2% (n=56)	GA: 46.3% (n=63)	AA: 12.5% (n=17)	0.994
rs1255998 C>G	CC: 75% (n=102)	CG: 24.3% (n=33)	GG: 0.7% (n=1)	0.633
rs2987983 T>C	TT: 47.8% (n=65)	TC: 39.7% (n=54)	CC: 12.5% (n=17)	0.557
rs3020449 C>T	CC: 19.1 (n=26)	CT: 52.9% (n=72)	TT: 27.9% (n=38)	0.736
rs3020450 G>A	GG: 47.8% (n=65)	GA: 39.7% (n=54)	AA: 12.5% (n=17)	0.557
rs944050 A>G	AA: 86.8% (n=118)	AG: 12.5% (n=17)	GG: 0.7% (n=1)	0.904
rs1887944 C>T	CC: 64% (n=87)	CT: 34.5% (n=47)	TT: 1.5% (n=2)	0.294

#### *4.2.2 Ocena wpływu występowania określonych genotypów badanych polimorfizmów genów kodujących ER $\alpha$ i ER $\beta$ na występowanie ZM w badanej grupie kobiet*

W wyniku przeprowadzonych analiz wykazałam, że posiadanie określonych genotypów w trzech z osiemnastu zbadanych przeze mnie polimorfizmów genów kodujących ER może mieć związek z rozwojem ZM u kobiet po menopauzie. Kobiety posiadające allel T w miejscu polimorficznym rs2234693 genu kodującego ER $\alpha$  (homozygoty TT lub heterozygoty TC) zdecydowanie częściej spełniały kryteria rozpoznania ZM w porównaniu do homozygot CC. Tą samą zależność zaobserwowałam w przypadku polimorfizmów rs6902771 oraz rs7774230 tego samego genu. Kobiety posiadające allel C w tych miejscach polimorficznych (homozygoty CC lub heterozygoty CT) tak samo częściej spełniały kryteria rozpoznania ZM w porównaniu do homozygot TT (Tabela 12).

Jak pokazują wyniki przedstawione w Tabeli 12 częstości występowania ZM dla tych trzech polimorfizmów były identyczne. Kobiety posiadające wariant TT w miejscu polimorficznym rs2234693, w miejscach polimorficznych rs6902771 oraz rs7774230 posiadają wariant CC. Natomiast kobiety posiadające wariant CC w miejscu polimorficznym rs2234693, w miejscach polimorficznych rs6902771 oraz rs7774230 posiadają wariant TT. Można więc podejrzewać, że polimorfizmy te w badanej przeze mnie populacji dziedziczą się wspólnie.

Podobne zależności znalazłam dla par polimorfizmów w obrębie genu kodującego ER $\beta$ : rs1256049 i rs944050 (oddzielone od siebie 24006 parami zasad) oraz rs2987983 i rs3020450 (oddzielone od siebie 4649 parami zasad). Kobiety posiadające wariant GG w miejscu polimorficznym rs1256049, w miejscu polimorficznym rs944050 posiadają wariant AA. Natomiast kobiety posiadające wariant TT w miejscu polimorficznym rs2987983, w miejscu polimorficznym rs3020450 posiadają wariant GG (Tabela 13).

Tabela 12. Ocena wpływu wybranych polimorfizmów w genie ER $\alpha$  na występowanie ZM wśród badanych kobiet.

Badany polimorfizm	Odsetek kobiet spełniających kryteria rozpoznania ZM w poszczególnych genotypach			Wartość P w teście chi <sup>2</sup>
ER $\alpha$				
rs2234693 T>C	TT: 40.9 % (n=29)	TC: 46.5 % (n=33)	<b>CC: 12.7 % (n=9)</b>	0.0189
rs9340799 A>G	AA: 45.1 % (n=32)	AG: 47.9 % (n=34)	GG: 7.0 % (n=5)	0.7459
rs1709181 T>C	TT: 36.6 % (n=26)	TC: 45 % (n=32)	CC: 18.3 % (n=13)	0.8415
rs1709183 A>G	AA: 56.9 % (n=37)	AG: 38.5 % (n=25)	GG: 4.6 % (n=3)	0.8962
rs2175898 A>G	AA: 62.3 % (n=43)	AG: 37.7 % (n=26)	GG: 0 % (n=0)	0.1136
rs6902771 C>T	CC: 40.9 % (n=29)	CT: 46.5 % (n=33)	<b>TT: 12.7 % (n=9)</b>	0.0189
rs712221 A>T	AA: 36.6 % (n=26)	AT: 43.7 % (n=31)	TT: 19.7 % (n=14)	0.8225
rs7774230 C>T	CC: 40.9 % (n=29)	CT: 46.5 % (n=33)	<b>TT: 12.7 % (n=9)</b>	0.0189
rs827417 A>G	AA: 39.1 % (n=27)	AG: 42.0 % (n=29)	GG: 18.8 % (n=13)	0.7513
rs9322331 C>T	CC: 48.6 % (n=34)	CT: 51.4 % (n=36)	TT: 0 % (n=0)	0.3332
Zmienne porównano testem chi-kwadrat.				

W przypadku polimorfizmu rs3020449 genu kodującego ER $\beta$  także zaobserwowałam zależność pomiędzy posiadaniem określonych jego alleli a rozpoznaniem ZM wśród badanych kobiet (Tabela 13). Niemniej jednak zależność ta nie była znamienna statystycznie ( $P=0.085$ ), wobec tego podzieliłam badane kobiety na dwie grupy ze względu na posiadanie allelu C w badanym miejscu polimorficznym. W wyniki przeprowadzenia dalszych analiz stwierdziłam, że kobiety posiadające allel C w tym miejscu polimorficznym (homozygoty CC lub heterozygoty CT) dwukrotnie częściej spełniały kryteria rozpoznania ZM w porównaniu do homozygot TT (64.8 % vs. 35.2 %,  $P=0.048$ ).

Tabela 13. Ocena wpływu wybranych polimorfizmów w genie ER $\beta$  na występowanie ZM w badanej grupie.

Badany polimorfizm ER $\beta$	Odsetek kobiet spełniających kryteria rozpoznania ZM w poszczególnych genotypach			Wartość P w teście chi <sup>2</sup>
	GG: 87.3% (n=62)	GA: 12.7% (n=9)	AA: 0% (n=0)	
rs1256049 G>A	GG: 87.3% (n=62)	GA: 12.7% (n=9)	AA: 0% (n=0)	0.5766
rs4986938 G>A	GG: 43.7% (n=31)	GA: 46.5% (n=33)	AA: 9.9% (n=7)	0.5909
rs1255998 C>G	CC: 76.1% (n=54)	CG: 23.9% (n=17)	GG: 0% (n=0)	0.5710
rs2987983 T>C	TT: 52.1% (n=37)	TC: 39.4% (n=28)	CC: 8.5% (n=6)	0.2821
rs3020449 C>T	CC: 14.1% (n=10)	CT: 50.7% (n=36)	TT: 35.2% (n=25)	<b>0.0855</b>
rs3020450 G>A	GG: 52.1% (n=37)	GA: 39.4% (n=28)	AA: 8.5% (n=6)	0.2821
rs944050 A>G	AA: 87.3% (n=62)	AG: 12.7% (n=9)	GG: 0% (n=0)	0.5766
rs1887944 C>T	CC: 60.6% (n=43)	CT: 39.4% (n=28)	TT: 0% (n=0)	0.1758
Zmienne porównano testem chi-kwadrat.				

Uzyskane wyniki pozwoliły mi także na dokładne wyliczenie ilorazu szans (OR) wystąpienia ZM w zależności od posiadania określonych genotypów ER. Posiadanie genotypu TT w miejscu polimorficznym rs2234693 oraz genotypu CC w polimorfizmach rs6902771 i rs7774230 genu kodującego ER $\alpha$  prawie trzykrotnie zwiększało szansę wystąpienia ZM wśród badanych kobiet w porównaniu do posiadania pozostałych genotypów w tych trzech miejscach polimorficznych. Ponadto posiadanie genotypu CX (heterozygoty CT oraz homozygoty CC) w polimorfizmie rs3020449 genu kodującego ER $\beta$  ponad dwukrotnie zwiększało szansę wystąpienia ZM wśród badanych kobiet w porównaniu do posiadania genotypu TT. Dokładne wartości oraz 95 % przedział ufności dla polimorfizmów genów ER, dla których zaobserwowano istnienie tych zależności przedstawia Tabela 14.

Tabela 14. Iloraz szans (OR) wystąpienia ZM w zależności od posiadania określonych genotypów miejsc polimorficznych genów ER, dla których wykazano istnienie zależności między posiadaniem określonych genotypów a rozwojem ZM

<b>Badany polimorfizm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>OR (95 % CI)</b>
rs2234693	TT	2.76 (1.26; 6.07)
rs6902771	CC	2.76 (1.26; 6.07)
rs7774230	CC	2.76 (1.26; 6.07)
rs3020449	CX	2.17 (0.99; 4.77)

#### *4.2.3 Ocena wpływu występowania określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER na występowania poszczególnych składowych ZM w badanej grupie kobiet*

Kolejnym krokiem było zbadanie czy posiadanie określonych genotypów w osiemnastu zbadanych przeze mnie polimorfizmach genów kodujących ER może mieć związek z występowaniem poszczególnych jego składowych. W przypadku polimorfizmów genu kodującego ER $\alpha$  wykazałam znamienne różnice w surowiczych stężeniach cholesterolu HDL w zależności od posiadania określonych genotypów w następujących polimorfizmach: rs2234693, rs6902771 i rs7774230. Homozygoty TT w miejscu polimorficznym rs2234693 miały znamienne niższe stężenie cholesterolu HDL niż heterozygoty TC i homozygoty CC. Homozygoty CC w miejscach polimorficznych rs6902771 i rs7774230 miały znamienne niższe stężenie cholesterolu HDL niż heterozygoty CT i homozygoty TT ( $59 \pm 14$  mg/dl vs.  $65 \pm 16$  mg/dl i  $68 \pm 15$  mg/dl,  $P=0.020$ ). Wyniki przedstawia Tabela 15.

Tabela 15. Zależność między występowaniem poszczególnych składowych ZM a posiadaniem określonych alleli w trzech występujących wspólnie polimorfizmach rs2234693, rs6902771 oraz rs7774230 genu kodującego ER $\alpha$

Badane polimorfizmy	N=45	N=72	N=25	Wartość P
rs2234693 T>C	TT	TC	CC	
rs6902771 C>T	CC	CT	TT	
rs7774230 C>T	CC	CT	TT	
Obwód pasa (cm)	96.7 $\pm$ 11.2	95.8 $\pm$ 10.9	91.6 $\pm$ 10.3	0.682
Ch HDL (mg/dl)	<b>58.5 <math>\pm</math> 14.9*</b>	65.7 $\pm$ 16.2	68.4 $\pm$ 14.6	0.020
Poziom TG (mg/dl)	121.7 $\pm$ 44.8	117.2 $\pm$ 50.1	108.5 $\pm$ 38.0	0.441
Glikemia na czczo (mg/dl)	98.2 $\pm$ 10.0	97.3 $\pm$ 13.1	96.9 $\pm$ 10.8	0.604
SBP (mmHg)	128.0 $\pm$ 16.3	132.0 $\pm$ 15.0	130.9 $\pm$ 11.9	0.464
DBP (mmHg)	77.4 $\pm$ 7.8	79.5 $\pm$ 8.7	77.5 $\pm$ 8.1	0.220
Dane przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej $\pm$ SD				
Zmienne w poszczególnych grupach porównywano testem analizy wariancji (ANOVA). W przypadku wykazania znamiennych różnic posłużono się testem post-hoc NIR (najmniejszych istotnych różnic).				
*p<0.05 pomiędzy TT a TC i CC dla rs2234693 oraz pomiędzy CC a CT i TT dla rs6902771 i rs7774230				

W przypadku polimorfizmu rs3020449 genu kodującego ER $\beta$  wykazałam znamienne różnice w surowiczych stężeniach cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL w zależności od posiadania określonych genotypów. Homozygoty TT w porównaniu z heterozygotami CT i homozygotami CC miały znamienne niższe stężenia cholesterolu całkowitego (206  $\pm$  48 mg/dl vs. 224  $\pm$  41 mg/dl i 231  $\pm$  35 mg/dl, P=0.020) i cholesterolu LDL (120  $\pm$  47 mg/dl vs. 135  $\pm$  36 mg/dl i 145  $\pm$  35 mg/dl, P=0.014) w surowicy.

Ponadto homozygoty TT w miejscu polimorficznym rs2234693 genu kodującego ER $\alpha$  dwukrotnie częściej przyjmowały leki hipotensyjne w porównaniu do homozygot CC (46 % vs. 24 %) i półtorakrotnie częściej w porównaniu do kobiet posiadających jeden allel C (heterozygoty TC i homozygoty CC) (46 % vs. 30 %). Do najczęściej stosowanych należały leki beta-adrenolityczne (n=25), inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę (iACE) (n=12), leki moczopędne (n=5), inhibitory kanałów wapniowych (n=3) oraz inhibitory receptorów dla angiotensyny (sartany) (n=2). Dane te także pozwoliły mi na dokładne wyliczenie ilorazu szans

(OR) występowania NT w zależności od posiadania określonych genotypów ER. Posiadanie genotypu TT w miejscu polimorficznym rs2234693 genu kodującego ER $\alpha$  dwukrotnie zwiększało szansę przyjmowania leków hipotensyjnych w porównaniu do heterozygot TC i homozygot CC, co jest równoznaczne z rozpoznaniem u tych kobiet NT [OR=2.00; 95%CI (0.91, 4.4)].

Podobne różnice zaobserwowałam w liczbie kobiet przyjmujących leki hipolipemizujące w obu grupach. Homozygoty TT w miejscu polimorficznym rs2234693 genu kodującego ER $\alpha$  trzykrotnie częściej przyjmowały leki hipolipemizujące w porównaniu do homozygot CC (33 % vs. 11.5 %) i prawie dwukrotnie częściej w porównaniu do kobiet posiadających co najmniej jeden allel C (heterozygoty TC i homozygoty CC) (33 % vs. 18 %). Posiadanie genotypu TT w miejscu polimorficznym rs2234693 genu kodującego ER $\alpha$  dwukrotnie zwiększało szansę przyjmowania leków hipolipemizujących wśród badanych kobiet w porównaniu do posiadania genotypów TC i CC [(OR=2.00, 95%CI(1.01, 4.84)]. Większość badanych przyjmowała jednak statyny (n=31). Fibraty przyjmowało zaledwie 5 kobiet.

#### *4.2.4 Ocena wpływu występowania określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER na wskaźniki insulinooporności/wrażliwości, surowicze poziomy adiponektyny oraz CRP w badanej grupie*

Insulinooporność leży u podstaw patogenezy ZM. Kolejnym więc krokiem mojego badania była ocena wpływu posiadania określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER na wskaźniki insulinooporności/wrażliwości wśród badanych kobiet. Kobiety z rozpoznaniem ZM w porównaniu do kobiet niespełniających kryteriów jego rozpoznania miały znamienne wyższe stężenia insuliny na czczo, wyższy wskaźnik HOMA-R, niższy wskaźnik QUICKI oraz wyższy stosunek triglicerydów do cholesterolu HDL. Mediana surowiczych stężeń adiponektyny była mniejsza wśród kobiet z rozpoznaniem ZM w porównaniu do tych, które nie spełniały kryteriów jego rozpoznania. Różnica ta nie była jednak znamienna statystycznie (P=0.494). Kobiety z rozpoznaniem ZM miały natomiast

wyższe surowicze stężenia CRP w porównaniu do tych, które nie spełniały kryteriów jego rozpoznania (P=0.010). Wyniki przedstawia Tabela 16.

Tabela 16. Porównanie wskaźników insulinooporności/wrażliwości oraz surowiczych stężeń adiponektyny i CRP wśród kobiet spełniających i niespełniających kryteriów rozpoznania ZM

	<b>Kobiety spełniające kryteria rozpoznania ZM N=76</b>	<b>Kobiety niespełniające kryteriów rozpoznania ZM N=71</b>	<b>Wartość P</b>
Glikemia (mg/dl)	99 (93 – 106)	94 (88 – 97.5)	0.001
Insulinemia na czczo (uIU/ml)	9.6 (7.1 – 18.7)	6.8 (4.8 – 8.6)	<0.001
HOMA-IR	2.3 (1.6 – 4.7)	1.5 (1.1 – 2.0)	<0.001
QUICKI	0.6 (0.5 – 0.6)	0.7 (0.6 – 0.7)	<0.001
TG/HDL	2.3 (1.5 – 3.1)	1.3 (0.9 – 1.9)	<0.001
Adiponektyna (ng/ml)	11.0 (6.1 – 16.2)	15.2 (0.0 – 20.0)	0.494
CRP (mg/l) *	1.6 (0.9 – 3.2)	0.8 (0.4 – 1.5)	0.010

HOMA-IR – model oceny insulinooporności (z ang. *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*), QUICKI – ilościowy indeks oceny insulinowrażliwości (z ang. *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*)  
 TG/HDL – stosunek triglicerydów do cholesterolu HDL (z ang. *Triglycerides/HDL Ratio*)  
 Różnice między grupami analizowano przy użyciu testu t-studenta lub jego nieparametrycznego odpowiednika testu U Manna-Whitneya.  
 Dane przedstawiono jako medianę oraz rozstęp międzykwartyłowy (Q1 – Q3).

Dokładna analiza wyników nie wykazała jednak, aby którykolwiek z badanych przeze mnie polimorfizmów wpływał na surowicze poziomy insuliny na czczo, wyliczone wskaźniki insulinooporności/wrażliwości (HOMA-IR, QUICKI, TG/HDL) oraz surowicze stężenia adiponektyny i CRP w badanej przeze mnie grupie. W Tabelach 17 i 18 przedstawiłam wyniki dla tych polimorfizmów, które w poprzednich analizach miały związek z występowaniem ZM.



Tabela 17. Ocena wpływu występowania określonych alleli w trzech występujących wspólnie miejscach polimorficznych rs2234693, rs6902771 oraz rs7774230 genu kodującego ER $\alpha$  na wskaźniki insulinooporności/wrażliwości, surowicze poziomy adiponektyny oraz CRP

<b>Badane polimorfizmy</b>	<b>N=42</b>	<b>N=69</b>	<b>N=25</b>	<b>Wartość P</b>
rs2234693 T>C	TT	TC	CC	
rs6902771 C>T	CC	CT	TT	
rs7774230 C>T	CC	CT	TT	
Glikemia na czczo (mg/dl)	99 (93 – 104)	96 (89 – 102)	95 (88 – 102)	0.827
Insulinemia na czczo (uIU/ml)	9.4 (7.2 – 11.5)	7.6 (5.2 – 9.4)	6.8 (5.3 – 10.8)	0.273
Współczynnik HOMA-IR	2.2 (1.8 – 2.6)	1.7 (1.2 – 2.5)	1.5 (1.2 – 2.6)	0.990
Współczynnik QUICKI	0.6 (0.6 – 0.6)	0.6 (0.6 – 0.7)	0.7 (0.6 – 0.7)	0.268
TG/HDL	2.0 (1.4 – 2.7)	1.6 (1.0 – 2.6)	1.5 (1.1 – 2.0)	0.155
Adiponektyna (ng/ml)	7.9 (0.0 – 18.1)	14.0 (6.4 – 18.9)	11.8 (5.7 – 17.1)	0.281
CRP (mg/l)	2.2 (1.3 – 3.1)	0.9 (0.5 – 1.8)	0.8 (0.3 – 1.3)	0.130
Dane przedstawiono jako medianę oraz rozstęp międzykwartyłowy (Q1 – Q3). Zmienne w poszczególnych grupach porównywano testem analizy wariancji (ANOVA).				

Tabela 18. Ocena wpływu występowania określonych alleli w miejscu polimorficznym rs3020449 genu kodującego ER $\beta$  na wskaźniki insulinooporności/wrażliwości, surowicze poziomy adiponektyny oraz CRP w badanej grupie

<b>rs3020449 C&gt;T</b>	<b>CC N=26</b>	<b>CT N=72</b>	<b>TT N=38</b>	<b>Wartość P</b>
Glikemia na czczo (mg/dl)	93 (86 – 101)	97 (91 – 105)	96 (91 – 103)	0.222
Insulinemia na czczo (uIU/ml)	7.8 (4.8 – 18.7)	7.8 (6.0 – 10.9)	7.4 (5.4 – 10.1)	0.872
Współczynnik HOMA-IR	2.0 (1.1 – 4.4)	1.9 (1.5 – 2.7)	1.7 (1.2 – 2.5)	0.807
Współczynnik QUICKI	0.6 (0.5 – 0.7)	0.6 (0.6 – 0.7)	0.6 (0.6 – 0.7)	0.669
TG/HDL	1.9 (1.4 – 2.7)	1.8 (1.2 – 2.6)	1.5 (1.1 – 2.4)	0.860
Adiponektyna (ng/ml)	14.1 (0.1 – 19.0)	13.3 (8.6 – 18.1)	7.3 (0.0 – 18.2)	0.156
CRP (mg/l)	0.9 (0.6 – 2.2)	0.9 (0.5 – 3.0)	1.4 (0.5 – 3.2)	0.134
Dane przedstawiono jako medianę oraz rozstęp międzykwartyłowy (Q1 – Q3). Zmienne w poszczególnych grupach porównywano testem analizy wariancji (ANOVA).				

Surowicze poziomy adiponektyny wśród kobiet spełniających kryteria rozpoznania ZM korelowały ujemnie z surowiczymi stężeniami insuliny na czczo ( $r = -0.422$ ,  $P=0.028$ ) oraz dodatnio z wartościami wskaźnika QUICKI ( $R=0.469$ ,  $P=0.014$ ) i surowiczymi stężeniami HDL-cholesterolu ( $R=0.415$ ,  $P=0.031$ ).

#### **4.3 OCENA WPLYWU POSIADANIA OKREŚLONYCH ALLELI W MIEJSCACH POLIMORFICZNYCH GENÓW KODUJĄCYCH ER NA SKŁAD CIAŁA BADANYCH KOBIET**

ZM jest konsekwencją insulinooporności tkanek, która najczęściej jest wynikiem obecności otyłości, a co za tym idzie zawartości tkanki tłuszczowej. Wobec tego dokonałam także analizy wpływu posiadania określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER $\alpha$  i ER $\beta$  na skład ciała badanych kobiet. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdziłam istnienie zależności między posiadaniem określonego genotypu w polimorfizmie rs1709183 genu kodującego ER $\alpha$  a zawartością całkowitej tkanki tłuszczowej. Heterozygoty AG w tym miejscu polimorficznym charakteryzowały się mniejszą zawartością całkowitej tkanki tłuszczowej niż homozygoty AA i GG ( $P=0.037$ ) (Tabela 19). W przypadku wspólnie występujących polimorfizmów: rs2234693, rs6902771 i rs7774230 tego samego genu także zaobserwowałam różnicę pomiędzy posiadaniem określonych genotypów a zawartością całkowitej tkanki tłuszczowej. Niemniej jednak różnica ta była na granicy znamienności statystycznej ( $P=0.080$ ), wobec tego podzieliłam badane kobiety na dwie grupy ze względu na posiadanie allelu C w miejscu polimorficznym rs2234693 oraz allelu T w miejscach polimorficznych rs6902771 i rs7774230. Kobiety nieposiadające allelu C w miejscu polimorficznym rs2234693 (homozygoty TT) charakteryzowały się wyższą zawartością całkowitej tkanki tłuszczowej w porównaniu do kobiet posiadających allel C (homozygoty CC i heterozygoty TC) ( $28.9 \pm 8.7$  kg vs.  $25.6 \pm 8.6$  kg,  $P=0.048$ ). Analogiczną zależność zaobserwowałam w przypadku polimorfizmów rs6902771 i rs7774230. Kobiety nieposiadające allelu T w tych miejscach polimorficznych (homozygoty CC) charakteryzowały się wyższą zawartością całkowitej tkanki tłuszczowej w porównaniu do kobiet posiadających allel T (homozygoty TT i heterozygoty CT)

( $28.9 \pm 8.7$  kg vs.  $25.6 \pm 8.6$  kg,  $P=0.048$ ). Ponadto wykazałam zależność między posiadaniem określonych genotypów w miejscu polimorficznym rs2175898 genu kodującego ER $\alpha$  a wzrostem badanych kobiet. Homozygoty GG w tym miejscu polimorficznym miały znamienne wyższy wzrost niż heterozygoty AG i homozygoty AA ( $P=0.048$ ). Pomimo tego nie wykazałam, aby grupy te różniły się pod względem BMI ( $P=0.709$ ) (Tabela 21).

Tabela 19. Ocena wpływu występowania określonych alleli w miejscu polimorficznym rs1709183 genu kodującego ER $\alpha$  na skład ciała w badanej grupie

<b>rs1709183 A&gt;G</b>	<b>AA N=71</b>	<b>AG N=49</b>	<b>GG N=7</b>	<b>Wartość P</b>
Masa ciała (kg)	71.0 (65.1 – 77.9)	67.6 (60.6 – 76.8)	71.9 (65.3 -84.8)	0.192
Wzrost (cm)	164.0 (16.0 – 16.6)	164.0 (16.0 – 17.0)	162.0 (16.0 – 17.6)	0.758
BMI	26.6 (24.5 – 29.4)	25.9 (23.1 – 28.6)	25.5 (23.7 – 33.8)	0.124
Zawartość tk. tłuszczowej (kg)	26.6 (20.6 – 31.4)	<b>23.0 (17.9 – 30.5) *</b>	28.3 (24.5 – 37.5)	0.037
Zawartość wody (kg)	33.0 (30.3 – 34.8)	31.7 (29.7 – 35.6)	36.0 (32.1 – 39.3)	0.237
FFM (kg)	46.2 (43.6 – 48.4)	44.4 (42.3 – 48.7)	50.1 (44.8 – 53.7)	0.291
Dane przedstawiono jako medianę oraz rozstęp międzykwartyłowy (Q1 – Q3). Zmienne w poszczególnych grupach porównywano testem analizy wariancji (ANOVA). W przypadku wykazania znamienych różnic posłużono się testem post-hoc NIR (najmniejszych istotnych różnic). * $p<0.05$ pomiędzy AG a AA i GG				

Tabela 20. Ocena wpływu występowania określonych alleli w trzech występujących wspólnie miejscach polimorficznych rs2234693, rs6902771 oraz rs7774230 genu kodującego ER $\alpha$  na skład ciała w badanej grupie

<b>Badane polimorfizmy</b>	<b>N=42</b>	<b>N=69</b>	<b>N=25</b>	<b>Wartość P</b>
rs2234693 T>C	TT	CT	CC	
rs6902771 C>T	CC	CT	TT	
rs7774230 C>T	CC	CT	TT	
Masa ciała (kg)	71.5 (66.0 – 83.7)	70.8 (64.3 – 77.9)	67.8 (61.8 – 73.4)	0.203
Wzrost (cm)	164.0 (16.0 – 16.9)	163.0 (16.0 – 16.7)	163.0 (16.0 – 16.6)	0.369
BMI	26.4 (24.5 – 30.6)	27.1 (24.2 – 29.2)	25.0 (22.8 – 28.8)	0.509
Zawartość tk. tłuszczowej (kg)	26.7 (23.5 – 34.3)	25.0 (20.3 – 30.8)	21.0 (17.7 – 27.9)	<b>0.080</b>
Zawartość wody (kg)	32.9 (31.2 – 36.8)	32.9 (30.3 – 35.0)	31.2 (30.0 – 33.9)	0.326
FFM (kg)	46.9 (43.0 – 51.3)	45.8 (43.2 – 48.1)	44.8 (43.1 – 47.7)	0.199
Dane przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej $\pm$ SD Zmienne w poszczególnych grupach porównywano testem analizy wariancji (ANOVA).				

Tabela 21. Ocena wpływu występowania określonych alleli w miejscu polimorficznym rs2175898 genu kodującego ER $\alpha$  na skład ciała w badanej grupie

<b>rs2175898 A&gt;G</b>	<b>AA N=87</b>	<b>AG N=44</b>	<b>GG N=3</b>	<b>Wartość P</b>
Masa ciała (kg)	70.0 (64.7 – 77.6)	69.8 (63.1 – 81.8)	84.8 (66.8 – 85.3)	0.588
Wzrost (cm)	163.0 (16.0 – 16.6)	164.0 (16.0 – 17.0)	<b>172.0 (16.2 – 17.6)*</b>	0.048
BMI	26.4 (24.3 – 29.4)	26.2 (23.3 – 30.0)	27.4 (25.5 – 28.8)	0.709
Zawartość tk. tłuszczowej (kg)	25.8 (20.5 – 31.2)	24.7 (18.8 – 31.6)	31.3 (30.0 – 31.5)	0.661
Zawartość wody (kg)	32.9 (30.3 – 34.8)	31.8 (30.3 – 36.5)	38.5 (31.3 – 39.0)	0.312
FFM (kg)	45.9 (43.2 – 48.3)	44.8 (42.9 – 50.6)	53.3 (42.8 – 54.0)	0.443
Dane przedstawiono jako medianę oraz rozstęp międzykwartyłowy (Q1 – Q3). Zmienne w poszczególnych grupach porównywano testem analizy wariancji (ANOVA). W przypadku wykazania znamiennych różnic posłużono się testem post-hoc NIR (najmniejszych istotnych różnic). *p<0.05 pomiędzy GG a AA i AG				

#### 4.4 OCENA WPLYWU POSIADANIA OKREŚLONYCH ALLELI W MIEJSCACH POLIMORFICZNYCH GENÓW KODUJĄCYCH ER NA WYSTĘPOWANIE OBJAWÓW HIPOESTROGENEMII U BADANYCH KOBIET

Obecność polimorfizmów genów kodujących ER może mieć wpływ na ich ekspresję a co za tym idzie wrażliwość tkanek docelowych na działanie estrogenów. Wobec tego dokonałam również oceny czy posiadanie określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER może wpływać na stopień nasilenia objawów wpadowych. W tym celu wśród badanych kobiet zebrałam dokładny wywiad dotyczący występowania objawów hipostrogenemii wykorzystując kwestionariusz MRS (z ang. *Menopause Rating Scale*). Najwięcej kobiet zgłaszało wyczerpanie fizyczne i umysłowe (82.2 %), uderzenia gorąca oraz zwiększoną potliwość (79.4 %), pobolewanie stawów lub mięśni (79.4 %) oraz uczucie rozdrażnienia (78.5 %). Wyniki przedstawia Tabela 22.

Tabela 22. Występowanie objawów hipostrogenemii wśród badanych kobiet

Zgłaszane dolegliwości	Częstość zgłaszanych dolegliwości
Wyczerpanie fizyczne i umysłowe (ogólnie mniejsze możliwości, pogorszenie pamięci, obniżona zdolność koncentracji, zapominanie)	82.2 % (n=88)
Uderzenia gorąca, pocenie się (epizody pocenia się)	79.4 % (n=85)
Dyskomfort związany ze stawami i mięśniami (ból stawów, dolegliwości reumatyczne)	79.4 % (n=85)
Drażliwość (uczucie zdenerwowania, wewnętrzny niepokój, uczucie agresji)	78.5 % (n=84)
Nastroj depresyjny (uczucie przygnębienia, smutku, bycie bliskim płaczu, brak motywacji do działania, huśtawka nastrojów)	72.9 % (n=78)
Problemy ze snem (trudności z zasypianiem, trudności z przespaniem całej nocy, wczesne budzenie się)	72.0 % (n=77)
Kłopoty z sercem (obawa o czynność serca, nieregularne bicie serca, szybkie bicie serca, ucisk w piersi)	61.7 % (n=66)
Lęk (wewnętrzna nerwowość, uczucie paniki)	60.7 % (n=65)
Problemy z pęcherzem moczowym (trudności z oddawaniem moczu, zwiększona potrzeba oddawania moczu, nietrzymanie moczu)	55.1 % (n=59)
Problemy seksualne (zmiana w pożądaniu seksualnym, seksualnej aktywności i satysfakcji)	54.2 % (n=58)
Suchość pochwy (uczucie suchości lub pieczenia w pochwie, bolesność podczas stosunku)	51.4 % (n=55)

Mediana punktów oceniających stopień nasilenia objawów hipoestrogenemii w badanej populacji kobiet wynosiła 13 punktów (Q1-Q3: 10 - 18 pkt, min-max: 0 - 33 pkt). Nie zaobserwowałam zależności między posiadaniem określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER a ilością i stopniem natężenia objawów wypadowych wśród badanych kobiet.

## 5. DYSKUSJA

Wyniki badania NATPOL Plus dowiodły, że ZM występuje u ponad jednej czwartej populacji dorosłych Polaków (Wyrzykowski i wsp, 2005b). Biorąc pod uwagę jego następstwa takie jak T2DM oraz ChNS, ZM stanowi istotny problem współczesnej medycyny (Alberti i wsp, 2009). Menopauza jest następstwem wygaśnięcia czynności hormonalnej gonady żeńskiej i obecnie wiadomo, że niedobór estrogenów u kobiet po menopauzie prowadzi do rozwoju otyłości brzusznej i oporności na insulinę, czego konsekwencją jest hiperinsulinemia i jej niekorzystne następstwa metaboliczne (Rachoń i Teede, 2010). Estrogeny swoje działanie biologiczne wywołują oddziałując poprzez dwa izotypy ER: ER $\alpha$  i ER $\beta$ . W związku z wydłużaniem średniego czasu życia oraz podnoszeniem wieku emerytalnego coraz większa część życia kobiet przypada na okres po menopauzie, dlatego poznanie czynników predysponujących do rozwoju ZM może stanowić istotny element prewencji T2DM oraz chorób układu sercowo-naczyniowego w tej populacji. Z tego względu celem niniejszej pracy była ocena związku pomiędzy występowaniem określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER a występowaniem ZM i jego poszczególnych składowych u kobiet po menopauzie.

W badanej przez mnie populacji częstość występowania ZM wynosiła 52 % (n=76). Prawie wszystkie badane spełniające kryteria rozpoznania ZM miały otyłość brzuszna (96 %, n=73), 83 % z nich (n=63) miało podwyższone ciśnienie tętnicze krwi lub przyjmowało leki hipotensyjne. Trzy-czwarte kobiet (76 %, n=58) miało podwyższone stężenie triglicerydów w surowicy krwi, a ponad połowa (54 %, n=41) obniżone stężenie cholesterolu HDL. Ponad połowa pacjentek z ZM (51 %, n=39) miała nieprawidłowy poziom glikemii na czczo lub przyjmowała metforminę. W badaniu przeprowadzonym w 2015 roku w Hiszpanii wśród 716 kobiet po menopauzie kryteria ZM spełniało 61.7 % z nich (Orgaz Gallego i wsp., 2015). Badanie 250 włoskich kobiet po menopauzie także przeprowadzone w 2015 roku wykazało natomiast, że kryteria ZM spełniało 34.4 % z nich (Agnoli i wsp., 2015). Częstość występowania ZM wśród kobiet w Polsce będących po menopauzie zbliżona jest więc bardziej do tych z Hiszpanii. Niski odsetek kobiet spełniających

kryteria rozpoznania ZM wśród kobiet po menopauzie we Włoszech tłumaczyć należy stosowaniem przez nich diety śródziemnomorskiej (Kastorini i Panagiotakos, 2010).

Wśród przebadanych przeze mnie 19 polimorfizmów genów kodujących ER wykazałam, że cztery z nich (3 w obrębie genu kodującego ER $\alpha$  oraz 1 w obrębie genu kodującego ER $\beta$ ) mogą mieć związek z występowaniem ZM u kobiet po menopauzie. W przebadanej przez mnie grupie 147 uczestniczek ponad połowa (54%) spełniała kryteria rozpoznania ZM. Ponadto ZM znamienne częściej występował wśród tych kobiet, które w czterech miejscach polimorficznych (rs2234693, rs6902771, rs7774230 oraz rs3020449) posiadały określone allele. Homozygoty TT w polimorfizmie rs2234693 oraz homozygoty CC w polimorfizmach rs6902771 i rs7774230 znamienne częściej spełniały kryteria rozpoznania ZM niż heterozygoty i homozygoty CC w polimorfizmie rs2234693 oraz homozygoty TT w polimorfizmach rs6902771 i rs7774230. Ponadto kobiety posiadające allel C w miejscu polimorficznym rs3020449 (homozygoty CC lub heterozygoty CT) znamienne częściej spełniały kryteria rozpoznania ZM w porównaniu do homozygot TT.

Gallagher i wsp. (2007) także badali związek pomiędzy występowaniem określonych alleli w miejscach polimorficznych genu ER $\alpha$ . Podobnie jak ja wykazali oni zależność między posiadaniem określonych genotypów miejsca polimorficznego rs6902771 a występowaniem ZM, nie znaleźli jednak takiej zależności dla miejsc polimorficznych rs7774230 oraz rs2234693. Ponadto Ci sami badacze wskazali na istnienie zależności pomiędzy posiadaniem określonych genotypów miejsc polimorficznych rs9340799 oraz rs2175898 a występowaniem ZM, której to zależności ja nie znalazłam w badanej przeze mnie populacji. Najprawdopodobniej rozbieżność ta wynika z faktu, iż w przytoczonej przeze mnie pracy Gallagher i wsp. uczestnikami badania byli mężczyźni oraz kobiety rasy afroamerykańskiej, podczas gdy w mojej pracy przebadałam kobiety rasy kaukaskiej będące po menopauzie.

Należy dodatkowo zwrócić uwagę, że allele występujące we wspomnianych wcześniej trzech miejscach polimorficznych genu kodującego ER $\alpha$  (rs2234693, rs6902771, rs7774230) wykazują pewną analogię. Kobiety posiadające wariant TT w miejscu polimorficznym rs2234693, w miejscach polimorficznych rs6902771 oraz



rs7774230 posiadają wariant CC. Natomiast kobiety posiadające wariant CC w miejscu polimorficznym rs2234693, w miejscach polimorficznych rs6902771 oraz rs7774230 posiadają wariant TT. *Loci* tych polimorfizmów znajdują się blisko siebie w obrębie genu kodującego ER $\alpha$  - polimorfizmy rs2234693 i rs6902771 położone są w pierwszym intronie tego genu i oddzielone od siebie 5 454 parami zasad, natomiast polimorfizm rs7774230 leży w obrębie drugiego intronu i jest oddzielony o 904 parami zasad od *loci* rs2234693. Wobec tego, wymienione wcześniej miejsca polimorficzne mogą być traktowane jako haplotyp, czyli zbiór polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (z ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP), które dziedziczą się wspólnie. W przytoczonej już przeze mnie pracy Gallagher i wsp (2007) nie stwierdzili, aby allele obecne w obrębie miejsc polimorficznych rs2234693, rs6902771 i rs7774230 dziedziczyły się wspólnie. Możliwe więc, że wspólne dziedziczenie tych alleli jest charakterystyczne tylko dla rasy kaukaskiej. Dane z bazy NCBI również wskazują, że w populacji ogólnoswiatowej określone allele w tych miejscach polimorficznych nie występują wspólnie, gdyż wartości MAF (z ang. *Minor Allele Frequency*, czyli częstość allelu rzadszego) dla tych polimorfizmów nie są takie same. Co ciekawe, polimorfizm rs9340799 w obrębie genu ER $\alpha$ , inaczej zwany polimorfizmem miejsca restrykcyjnego *XbaI*, znajduje się w odległości jedynie 46 par zasad od miejsca polimorficznego rs2234693, jednak allele w obrębie tych miejsc nie dziedziczą się wspólnie. Podejrzewać można, iż wynika to ze struktury przestrzennej DNA, której ułożenie umożliwia interakcję pomiędzy fragmentami, które oddzielone od siebie znaczną ilością par zasad. Występowanie omówionego zjawiska wspólnego dziedziczenia zaobserwowałam również dla par polimorfizmów w obrębie genu kodującego ER $\beta$ : rs1256049 i rs944050 (oddzielone od siebie 24006 parami zasad) oraz rs2987983 i rs3020450 (oddzielone od siebie 4649 parami zasad). Kobiety posiadające wariant GG w miejscu polimorficznym rs1256049, w miejscu polimorficznym rs944050 posiadają wariant AA. Natomiast kobiety posiadające wariant TT w miejscu polimorficznym rs2987983, w miejscu polimorficznym rs3020450 posiadają wariant GG.

Czwarte miejsce polimorficzne, dla którego wykazałam zależność między posiadaniem określonych genotypów a występowaniem ZM to miejsce polimorficzne rs3020449 genu kodującego ER $\beta$ . Zgodnie z moją wiedzą jest to

pierwsze doniesienie, iż polimorfizm rs3020449 w obrębie genu kodującego ER $\beta$  może mieć związek z wystąpieniem ZM u kobiet po menopauzie.

Kolejnym celem moich badań była ocena czy posiadanie określonych genotypów w zbadanych przeze mnie polimorfizmach genów kodujących ER może mieć związek z występowaniem poszczególnych jego składowych, a także ze wskaźnikami insulinooporności/wrażliwości, profilem lipidowym, surowiczymi poziomami adiponektyny oraz CRP. Nie wykazałam, aby posiadanie określonych genotypów badanych przeze mnie miejsc polimorficznych w obrębie genów ER miało związek z występowaniem takich składowych ZM jak otyłość brzuszna, nieprawidłowa glikemia na czczo, hipertriglicerydemia oraz podwyższone ciśnienie tętnicze krwi. Wykazałam natomiast istnienie zależności pomiędzy surowiczymi stężeniami cholesterolu HDL a posiadaniem określonych genotypów we wcześniej opisanych już polimorfizmach genu kodującego ER $\alpha$  (rs2234693, rs6902771 i rs7774230). Homozygoty TT w miejscu polimorficznym rs2234693 miały znamienne niższe stężenie cholesterolu HDL niż heterozygoty TC i homozygoty CC. Homozygoty CC w miejscach polimorficznych rs6902771 i rs7774230 miały znamienne niższe stężenie cholesterolu HDL niż heterozygoty CT i homozygoty TT. Ponadto wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wykazały istnienie znamienych różnic w surowiczych stężeniach cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL w zależności od posiadania określonych genotypów w miejscu polimorficznym rs3020449 genu kodującego ER $\beta$ . Homozygoty TT miały znamienne niższe stężenia cholesterolu całkowitego i LDL w surowicy w porównaniu do heterozygot CT i homozygot CC. Wyniki przytoczonej już przeze mnie wcześniej pracy Gallagher i wsp (2007) nie potwierdzają jednak występowania takiej zależności w populacji afroamerykańskiej. U kobiet po menopauzie obserwuje się wzrost stężenia cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL, oraz spadek stężenia cholesterolu HDL w surowicy krwi, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. Przyjmowanie hormonalnej terapii zastępczej zapobiega tym zmianom co wskazuje, że estrogeny mają duży wpływ na poziom lipidów we krwi (Jensen, 1991). Można zatem przypuszczać, że obserwowane niższe stężenia cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL oraz wyższe cholesterolu HDL u kobiet posiadających określone genotypy w trzech wymienionych wcześniej miejscach polimorficznych genu kodującego

ER $\alpha$  (rs2234693, rs6902771 i rs7774230) oraz w jednym miejscu polimorficznym rs3020449 genu kodującego ER $\beta$  mogą być efektem zwiększonej ekspresji lub wrażliwości tych receptorów na działanie estrogenów. Jak wiadomo, u kobiet po menopauzie pomimo wygaśnięcia czynności hormonalnej gonad nie dochodzi do bezwzględnego braku estrogenów. Tkanka tłuszczowa dzięki wysokiej aktywności aromatazy ma bowiem zdolność do przekształcania androstendionu pochodzenia nadnerczowego do estronu, który także jest silnym agonistą ER. Ponadto estron przy udziale 17 $\beta$ -dehydrogenazy steroidowej może być także przekształcany do 17 $\beta$ -estradiolu (Gruber i wsp, 2002).

Ponadto wykazałam, że kobiety z genotypem TT w miejscu polimorficznym rs2234693 trzykrotnie częściej przyjmowały leki hipolipemizujące w porównaniu do kobiet posiadających genotyp CC. Co więcej, kobiety z genotypem TT w tym samym miejscu polimorficznym dwukrotnie częściej przyjmowały leki hipotensyjne w porównaniu do kobiet z genotypem CC, co oznacza, że częściej występowało u nich NT. Można przypuszczać więc, że posiadanie genotypu CC w tym miejscu polimorficznym także zwiększa wrażliwość ER, a jak wiadomo estrogeny wykazują także działanie hipotensyjne (Dąbrowska i Rachoń, 2013).

Wyniki badania Women's Health Study wskazały jednak na istnienie zależności pomiędzy posiadaniem określonych genotypów w obrębie miejsca polimorficznego rs2234693 a występowaniem nadwagi i otyłości wśród kobiet po menopauzie. Przebadano 543 kobiety i wykazano, że posiadanie genotypu TT w tym miejscu polimorficznym wiąże się z częstszym występowaniem otyłości w tej grupie w porównaniu do posiadania genotypu CC. Wśród kobiet posiadających genotyp TT ponad 18 % było otyłych, podczas gdy w grupie kobiet z genotypem CC otyłość dotyczyła jedynie 8 % badanych (Goulart i wsp., 2009). Wyniki innego dużego badania Framingham Heart Study dowodzą istnienia zależności między występowaniem określonych genotypów miejsca polimorficznego rs2234693 a obwodem pasa. Autorzy badania wykazali, że mężczyźni z genotypem CC w tym miejscu polimorficznym mieli mniejszy obwód pasa w porównaniu do mężczyzn o genotypie TC i TT. Zależności tej nie zaobserwowano jednak wśród kobiet (Fox i wsp., 2005). W badaniu przeprowadzonym na 1 780 osobach z Izraela powyżej 20 roku życia wykazano, że u mężczyzn posiadających genotyp CC w miejscu

polimorficznym rs2234697 wartości tętna oraz ciśnienia skurczowego są wyższe w porównaniu do heterozygot TC i homozygot TT (Peter i wsp., 2005). Istnieje zatem prawdopodobieństwo, że określone allele w polimorfizmie rs2234693 wykazują różny efekt w zależności od płci. Tak dzieje się w przypadku innego miejsca polimorficznego w genie ER $\alpha$ , miejsca rs9340799, które znajduje się jedynie 46 par zasad poniżej miejsca polimorficznego rs2234693. Obecność allelu C w tym miejscu wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem złamań kości, podczas gdy w przypadku mężczyzn ochronną rolę wykazuje allel T (Harslof i wsp., 2010).

Wyniki moich badań wykazały, że kobiety z rozpoznaniem ZM w porównaniu do kobiet niespełniających kryteriów jego rozpoznania miały znamienne wyższe stężenia insuliny na czczo, wyższy wskaźnik HOMA-IR, niższy wskaźnik QUICKI oraz wyższy stosunek triglicerydów do cholesterolu HDL co wskazuje na udział insulinooporności w patogenezie ZM. Adiponektyna jest cytokiną produkowaną przez adipocyty, która zwiększa wrażliwość tkanek na działanie insuliny. Efekt ten jest wynikiem jej wpływu na oksydację kwasów tłuszczowych i zmniejszenia magazynowania triglicerydów w mięśniach szkieletowych (Dyck, 2009). Wykazano, że wyższe stężenia adiponektyny zmniejszają ryzyko wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego (Wołk i wsp., 2007) oraz udaru w przebiegu miażdżycy tętnic (Zhang i wsp., 2015). W mojej pracy nie wykazałam, aby kobiety z rozpoznaniem ZM miały znamienne niższe surowicze stężenia tej adipokiny w porównaniu do kobiet niespełniających kryteriów jego rozpoznania. Niemniej jednak surowicze stężenia tej cytokiny wśród kobiet spełniających kryteria rozpoznania ZM korelowały ujemnie z surowiczymi stężeniami insuliny na czczo oraz dodatkowo z wartościami wskaźnika QUICKI i surowiczymi stężeniami HDL-cholesterolu. Wyniki te są zbieżne z wynikami innych autorów, którzy także wykazali, że stężenie tej adipokiny koreluje ujemnie ze stężeniem insuliny oraz dodatkowo ze stężeniem cholesterolu HDL (Mohammadzadeh i Ghaffari, 2014; Wołk i wsp, 2007). Kobiety z rozpoznaniem ZM miały także wyższe surowicze stężenia CRP w porównaniu do tych, które nie spełniały kryteriów jego rozpoznania. CRP należy do białek ostrej fazy dlatego jego stężenie w surowicy ulega podwyższeniu we wszystkich stanach zapalnych (zakażeniach, urazach, chorobach nowotworowych) (Du Clos, 2000). Wyniki badania przeprowadzonego wśród mieszkańców Gruzji także wykazały wyższe stężenia CRP w surowicy wśród osób z rozpoznaniem ZM w porównaniu do osób

niespełniających kryteriów jego rozpoznania (Sarbijani i wsp., 2015). Wyniki badań przeprowadzonych przez Ridker'a (2007) wykazały, że surowicze stężenia CRP są znamienne wyższe u osób otyłych w porównaniu do osób o prawidłowej masie ciała. Ndumele i wsp. (2006) wykazali natomiast, że surowicze stężenia CRP dodatkowo korelują z insulinoopornością tkanek niezależnie od występowania otyłości, nadciśnienia tętniczego, dyslipidemii, a także spożycia alkoholu i palenia papierosów. Obecnie surowicze stężenia CRP stanowią niezależny czynnik ryzyka sercowo-naczyniowego u kobiet po menopauzie (Ridker i wsp., 2000).

Dokładna analiza wyników moich badania nie wykazała jednak, aby którykolwiek z badanych przeze mnie polimorfizmów wpływał na surowicze poziomy insuliny na czczo, wyliczone wskaźniki insulinooporności/wrażliwości (HOMA-R, QUICKI, TG/HDL) oraz surowicze stężenia adiponektyny i CRP w badanej przeze mnie grupie. Nie stwierdziłam także związku pomiędzy posiadaniem określonych genotypów w obrębie badanych przeze mnie polimorfizmów ER a zawartością tkanki mięśniowej czy beztłuszczowej masy ciała oraz obwodu pasa, który silnie koreluje z insulinoopornością (Bonneau i wsp., 2014). Niemniej jednak, heterozygoty AG w obrębie miejsca polimorficznego rs1709183 charakteryzowały się mniejszą zawartością całkowitej tkanki tłuszczowej w porównaniu do homozygot AA i GG. Ponadto homozygoty TT miejsca polimorficznego rs2234693 miały większą zawartość całkowitej tkanki tłuszczowej w porównaniu do homozygot CC i heterozygot TC. Homozygoty CC miejsc polimorficznych rs6902771 i rs7774230 charakteryzowały się większą zawartością całkowitej tkanki tłuszczowej w porównaniu do homozygot TT i heterozygot CT. Dodatkowo znalazłam istnienie zależności między genotypem miejsca polimorficznego rs2175898 a wzrostem badanych kobiet. Homozygoty GG w tym polimorfizmie charakteryzowały się wyższym wzrostem w porównaniu do homozygot AA i heterozygot AG. Nie znalazłam jednak znaczących różnic w BMI pomiędzy tymi grupami. Wyższy wzrost u kobiet z genotypem GG miejsca polimorficznego rs2175898 może wiązać się ze zmniejszoną wrażliwością ER na działanie estrogenów w obrębie nasad kości długich podczas procesu wzrastania. Estrogeny bowiem przyspieszają kostnienie chrząstek nasad kości długich w okresie dojrzewania (Rochira i wsp., 2015). Zgodnie z moją wiedzą jest to pierwsze doniesienie, iż wymienione wyżej

polimorfizmy mogą mieć związek z zawartością całkowitej tkanki tłuszczowej i wzrostem ciała kobiet po menopauzie.

Wszystkie polimorfizmy, dla których znalazłam istotne statycznie zależności znajdują się w intronach genów ER. Powstaje pytanie w jaki sposób polimorfizmy w obrębie sekwencji intronowych mogą wpływać na opisane przeze mnie zależności. Sekwencje intronowe, jak wiadomo, nie kodują sekwencji białek, a więc zdają się nie mieć wpływu na ekspresję lub wrażliwość ER. Niemniej jednak Herrington i wsp. (2002) wykazali, że posiadanie allelu C w miejscu polimorficznym rs2234693 tworzy miejsce wiązania dla czynnika transkrypcyjnego B-myb. Obecność tego czynnika transkrypcyjnego może zatem powodować amplifikację transkrypcji genu ER $\alpha$ . To z kolei prowadzi do zwiększonej ilości ER $\alpha$  i wzmocnionej odpowiedzi na estrogeny w tkankach, w których dochodzi do ekspresji czynnika transkrypcyjnego B-myb. Znalezienie przeze mnie opisanych powyżej zależności związanych z posiadaniem określonych alleli w miejscach polimorficznych znajdujących się w obrębie sekwencji intronowych można tłumaczyć właśnie zmianami w poziomie ekspresji ER. U osób posiadających genotyp CC w miejscu polimorficznym rs2234693 może dochodzić do nasilenia transkrypcji genu ER $\alpha$  i zwiększonej ilości ER $\alpha$ . W konsekwencji, pomimo niskiego poziomu estrogenów w organizmie, zaobserwować można ich działanie biologiczne ze względu na zwiększoną ekspresję ER. Możliwe, iż w przypadku innych miejsc polimorficznych, dla których wykazałam zależność między obecnością określonych genotypów w tych miejscach a występowaniem ZM posiadanie określonych alleli również sprzyja wiązaniu dodatkowych czynników transkrypcyjnych aktywujących ekspresję genów zależnych od estrogenów.

Podsumowując wyniki moich badań stwierdziłam, że posiadanie określonych genotypów w 3 z 10 przebadanych przeze mnie polimorfizmów genu kodującego ER $\alpha$  oraz w 1 z 9 przebadanych przeze mnie polimorfizmów genu kodującego ER $\beta$  może mieć związek z występowaniem ZM u kobiet po menopauzie. W przypadku 3 miejsc polimorficznych w genie kodującym ER $\alpha$  wykazałam zależność między posiadaniem określonych alleli w tych miejscach a stężeniem cholesterolu HDL. W przypadku 1 miejsca polimorficznego w genie kodującym ER $\beta$  wykazałam

zależność między posiadaniem określonych alleli w tym miejscu a stężeniem cholesterolu całkowitego i LDL. Ponadto w przypadku 4 miejsc polimorficznych w genie kodującym ER $\alpha$  wykazałam zależność między posiadaniem określonych alleli w obrębie tych miejsc a zawartością całkowitej tkanki tłuszczowej. W przypadku 1 miejsca polimorficznego w genie kodującym ER $\alpha$  wykazałam zależność między posiadaniem określonych alleli w tym miejscu a wzrostem badanych kobiet.

## 6. WNIOSKI

Wyniki badań niniejszej pracy pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Posiadanie określonych genotypów w miejscach polimorficznych genów kodujących ER $\alpha$  (rs2234693, rs6902771, rs7774230) i ER $\beta$  (rs3020449) może mieć związek z rozwojem ZM u kobiet po menopauzie.
2. Istnieje związek pomiędzy posiadaniem określonych genotypów w miejscu polimorficznym rs2234693 a występowaniem nadciśnienia tętniczego i dyslipidemii. Ponadto posiadanie określonych genotypów w miejscach polimorficznych rs2234693, rs6902771, rs7774230 genu kodującego ER $\alpha$  ma wpływ na surowicze stężenia cholesterolu HDL.



## 7. STRESZCZENIE

ZM występuje u ponad jednej czwartej populacji dorosłych Polaków. Biorąc pod uwagę jego następstwa takie jak T2DM oraz ChNS, ZM stanowi istotny problem współczesnej medycyny. Menopauza jest następstwem wygaśnięcia czynności hormonalnej gonady żeńskiej i obecnie wiadomo, że niedobór estrogenów u kobiet po menopauzie prowadzi do rozwoju otyłości brzusznej i oporności na insulinę, czego konsekwencją jest hiperinsulinemia i jej niekorzystne następstwa metaboliczne. Estrogeny swoje działanie biologiczne wywołują oddziaływując poprzez dwa izotypy ER: ER $\alpha$  i ER $\beta$ . W związku z wydłużaniem średniego czasu życia oraz podnoszeniem wieku emerytalnego coraz większa część życia kobiet przypada na okres po menopauzie, dlatego poznanie czynników predysponujących do rozwoju ZM może stanowić istotny element prewencji T2DM oraz chorób układu sercowo-naczyniowego w tej populacji. Z tego względu celem niniejszej pracy była ocena związku pomiędzy występowaniem określonych alleli w miejscach polimorficznych genów kodujących ER a występowaniem ZM i jego poszczególnych składowych u kobiet po menopauzie. **MATERIAŁ I METODY:** W badaniu wzięło udział 147 kobiet po menopauzie. Wśród uczestniczek badania przeprowadziłam wywiad medyczny, dokonałam pomiaru masy i składu ciała, pomiaru obwodu pasa i ciśnienia tętniczego krwi. U każdej z pacjentek oznaczono stężenia glukozy, lipidów, insuliny oraz białka C-reaktywnego (CRP) i adiponektyny oraz dokonano analizy wybranych polimorfizmów przy użyciu platformy Sequenom MassARRAY. **WYNIKI:** Ponad połowa badanych kobiet (52 %) spełniała kryteria rozpoznania ZM. W przypadku trzech z dziesięciu analizowanych polimorfizmów w genie kodującym ER $\alpha$  (rs2234693, rs6902771, rs7774230) oraz jednego z dziewięciu analizowanych polimorfizmów w genie kodującym ER $\beta$  (rs3020449) wykazałam zależność pomiędzy posiadaniem określonych genotypów a obecnością ZM u kobiet po menopauzie. Ponadto wykazałam, że trzy wyżej wymienione polimorfizmy w genie kodujących ER $\alpha$  (rs2234693, rs6902771, rs7774230) dziedziczą się wspólnie. To samo zjawisko dotyczy dwóch par polimorfizmów w obrębie genu kodującego ER $\beta$  (rs1256049 i rs944050 oraz rs2987983 i rs3020450). Dla polimorfizmów rs2234693, rs6902771 i rs7774230 genu kodującego ER $\alpha$  wykazałam znamienne

różnice w surowiczych stężeniach cholesterolu HDL w zależności od posiadania określonych genotypów. W przypadku polimorfizmu rs3020449 genu kodującego ER $\beta$  wykazałam znamienne różnice w surowiczych stężeniach cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL w zależności od posiadania określonych genotypów. Posiadanie genotypu TT w miejscu polimorficznym rs2234693 genu kodującego ER $\alpha$  dwukrotnie zwiększało szansę przyjmowania leków hipotensyjnych oraz leków hipolipemizujących w porównaniu do heterozygot TC i homozygot CC. Kobiety spełniające kryteria rozpoznania ZM miały wyższe surowicze stężenia CRP w porównaniu do tych, które nie spełniały kryteriów jego rozpoznania. W przypadku czterech analizowanych polimorfizmów w genie kodującym ER $\alpha$  (rs1709183, rs2234693, rs6902771, rs7774230) wykazałam zależność pomiędzy posiadaniem określonych genotypów a zawartością tkanki tłuszczowej w badanej grupie. Ponadto homozygoty GG w miejscu polimorficznym rs2175898 genu kodującego ER $\alpha$  charakteryzowały się wyższym wzrostem niż heterozygoty AG i homozygoty AA

WNIOSKI: Istnieje związek pomiędzy posiadaniem określonych genotypów w miejscach polimorficznych genów kodujących ER a obecnością ZM wśród kobiet po menopauzie. Ponadto istnieją znamienne statystycznie różnice w surowiczych poziomach cholesterolu HDL, cholesterolu LDL i cholesterolu całkowitego pomiędzy kobietami posiadającymi określone genotypy w miejscach polimorficznych genów kodujących ER.

## 8. SUMMARY

Metabolic syndrome concerns one fourth of Polish people and leads to diabetes mellitus type 2 and ischemic heart disease. Postmenopausal women are highly affected by MS due to the lack of protective effects of estrogens. Estrogens act through their nuclear receptors (ER). In the near future because of the extension of life expectancy, the number of postmenopausal women will increase substantially. Therefore, investigating both the environmental and genetic factors predisposing to MS development has a great impact on women's health. The aim of this study was to find out whether bearing particular alleles at the ER gene polymorphism sites can predispose to the development of MS in women after menopause. **MATERIALS AND METHODS:** The sample consisted of 147 postmenopausal women. Apart from collecting careful medical history and analyzing body mass and body composition, patient's waist size and blood pressure were measured. Moreover, blood samples were analyzed to measure serum lipids, glucose, insulin, C-reactive protein and adiponectin. The analysis of ER genes polymorphisms was performed using Sequenom MassARRAY platform. **RESULTS:** More than a half (52 %) of women had MS. Three out of ten analyzed polymorphisms in ER $\alpha$  gene (rs2234693, rs6902771, rs7774230) and one out of nine analyzed polymorphisms in ER $\beta$  gene (rs3020449) were associated with the diagnosis of the MS. Additionally, three ER $\alpha$  gene polymorphisms (rs2234693, rs6902771, rs7774230) and two pairs of ER $\beta$  gene polymorphisms (rs1256049 and rs944050; rs2987983 and rs3020450) were inherited together. ER $\alpha$  gene polymorphisms rs2234693, rs6902771 and rs7774230 were associated with serum high-density lipoprotein concentrations. ER $\beta$  gene polymorphism rs3020449 was associated with serum total cholesterol concentrations and serum low-density lipoprotein concentrations. Moreover, TT genotype in the rs2234693 ER $\alpha$  gene polymorphism was associated with two times higher chance to take anti-hypertensive and cholesterol lowering medications in comparison to the TC and CC genotypes. Women with MS had higher levels of serum C-reactive protein in comparison to women without MS. Four ER $\alpha$  gene polymorphisms (rs1709183, rs2234693, rs6902771, rs7774230) were also associated with total fat tissue content. Additionally, GG homozygotes of ER $\alpha$  gene polymorphism rs2175898 had higher height in comparison with the AG heterozygotes and AA homozygotes.

CONCLUSIONS: Bearing the particular alleles at the ER gene polymorphism sites may impact the development of MS in women after menopause. Moreover, some of the ER gene polymorphisms variants may influence serum high-density lipoprotein, serum low-density lipoprotein and serum total cholesterol concentrations in women after menopause.

## **9. ANEKS**

Do pracy dołączono następujące dokumenty:

- Kopię zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKEBN/11/2011)
- wzór dokumentu z informacją o badaniu i pisemną zgodą pacjentki
- wzór formularza badania
- wzór formularza MRS

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/11/2011

Gdańsk, 2011-03-07

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 4.01.2011 r. na temat:  
**„Polimorfizm genów receptorów estrogenowych (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) a rozwój zespołu metabolicznego kobiet po menopauzie”** (praca na stopień doktora nauk medycznych mgr Karoliny Dąbrowskiej – słuchaczki I roku Dziennych Studiów Doktoranckich GUMed, planowana do przeprowadzenia we współpracy z Katedrą Żywienia Klinicznego 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 58 349 10 11

PRZEWODNICZĄCY  
Niezależna Komisja Bioetyczna  
do Spraw Badań Naukowych

prof. dr hab. med. Stefan Raszeja

## INFORMACJA O BADANIU ORAZ ŚWIADOMA ZGODA BADANEGO

Pełna nazwa programu badawczego: **Polimorfizm genów receptorów estrogenowych (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) a rozwój zespołu metabolicznego u kobiet po menopauzie.**

Nazwisko i imię: .....

Data urodzenia:.....Wiek:.....

Adres:.....

Telefon:.....

### **1. Założenia badania.**

Zespół metaboliczny (ZM) jest zbiorem czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, które mogą prowadzić do choroby niedokrwiennej serca i cukrzycy typu 2. Grupą osób szczególnie narażonych na rozwój ZM są kobiety po menopauzie. Dzieje się tak, gdyż po wystąpieniu menopauzy w organizmie kobiety przestają być produkowane estrogeny, żeńskie hormony płciowe, które wywierają wiele korzystnych efektów metabolicznych działając poprzez receptory estrogenowe (ER). Wcześniejsze badania sugerują, że zwiększone ryzyko rozwoju ZM może mieć związek z określonym polimorfizmem (stosunkowo częstą zmianą w DNA populacji) genów, które kodują ER.

Prowadzone badanie będzie trwało ok. 4 lata i ma na celu znalezienie ewentualnego związku pomiędzy występowaniem określonego polimorfizmu genów ER a rozwojem ZM u kobiet po menopauzie.

Niniejsze badanie zostało przyjęte i zatwierdzone przez Niezależną Komisję Bioetyczną do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, powołaną przez Rektora Uczelni, na podstawie rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej. Zadaniem Komisji jest ochrona praw badanego. Kierownikiem badania jest pan dr hab. n. med. Dominik Rachoń, kierownik Zakładu Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej Wydziału Nauk o Zdrowiu.

### **2. Postępowanie badawcze.**

Badanie będzie prowadzone w Zakładzie Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej Wydziału Nauk o Zdrowiu od stycznia 2011 do czerwca 2015 roku. W czasie badania dwukrotnie, w odstępie ok. 4 lat, wykonamy pomiary i badania mające na celu ocenę obecności składowych ZM. U każdej z pacjentek zostanie wykonany pomiar obwodu pasa i ciśnienia tętniczego oraz pobrana zostanie próbka krwi, która posłuży do oznaczenia glukozy we krwi na czczo, biochemicznego oznaczenia pełnego lipidogramu krwi, oznaczenia cytokin prozapalnych: interleukiny 6 (IL-6) i białka C-reaktywnego (CRP) oraz do zidentyfikowania polimorfizmów genów ER. Pomiar obwodu pasa, ciśnienia tętniczego i pobranie próbki krwi zostaną wykonane dwukrotnie – na początku badania i po okresie ok. 4 lat.

### **3. Ryzyko związane z badaniem.**

Pomiar obwodu pasa oraz ciśnienia tętniczego są badaniami całkowicie nieinwazyjnymi. Próbkę krwi zostaną pobrane dwukrotnie w objętości 5 ml w odstępie ok. 4 lat. Pobieranie krwi wiąże się z pewnymi niedogodnościami - ukłucie, swędzenie wyjątkowo siniak, zupełnie wyjątkowo zakażenie w miejscu ułtucia.

### **4. Korzyści związane z badaniem.**

Przeprowadzimy dwukrotnie szereg pomiarów i badań mających na celu ocenę obecności składowych ZM. Ponadto sprawdzimy jaki posiada Pani polimorfizm genu receptora estrogenowego. Przeprowadzimy wykład dotyczący możliwości zapobiegania rozwojowi ZM. Jeśli w trakcie badania znajdziemy związek pomiędzy występowaniem określonego polimorfizmu genu ER a rozwojem ZM, w przyszłości będzie można wyodrębnić grupy kobiet o wyższym ryzyku wystąpienia ZM i szybciej podjąć działania prewencyjne.

Wyniki tego badania mogą okazać się istotne w prewencji rozwoju zespołu metabolicznego i, co za tym idzie, w zapobieganiu chorobie wieńcowej serca i cukrzycy typu 2.

### **5. Poufność wyników badania.**

Zachowamy pełną poufność dotyczącą osobiście Pani oraz wyników badań. Wyniki badań mogą być przedstawione odpowiedniej agencji rządowej (np. Komisja Rejestracji Leków) z pominięciem Pani danych osobowych. Tajemnicę lekarską zachowamy także w publikacjach, dotyczących niniejszego badania. Jedynie prawomocna decyzja sądu może spowodować ujawnienie danych osobowych. Prawo Państwowe chroni poufność Pani danych osobowych.

### **6. Opłaty.**

Za uczestnictwo w badaniach nie przewidujemy opłaty Pani oraz rodzinie.

### **7. Jak uzyskać dodatkowe informacje.**

Zachęcamy Panią do zadawania pytań, które dotyczą badania, przed i czasie jego przebiegu. Otrzyma Pani także kopię niniejszego pisma do wglądu. Jeśli będzie miała Pani dodatkowe pytania prosimy dzwonić na numer +48 724 993 000 w czasie dnia.

### **8. Uczestnictwo.**

Może Pani w każdej chwili zrezygnować z uczestnictwa w tym badaniu, po zawiadomieniu dr hab. n. med. Dominika Rachonia lub mgr Karoliny Kuźbickiej (Zakład Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej Wydziału Nauk o Zdrowiu).



## 9. Podpisy.

Przeczytałam i zapoznałam się z wyżej podaną informacją oraz możliwością uzyskania dodatkowych informacji w każdej chwili. Zgadzam się uczestniczyć w niniejszym badaniu. W pełni rozumiem cel badania, sposób jego przeprowadzenia oraz wszystkie korzyści i zagrożenia wynikające z faktu uczestniczenia w badaniu.

Otrzymałam jedną kopię niniejszego pisma.

Podpis.....Data.....

Ja, niżej podpisana w pełni wyjaśniłam wszelkie szczegóły tego badania uczestnicze. W pełni świadomie podejmuję się prowadzenia tego badania i rozumiem swoją rolę.

Podpis ..... Nazwisko i imię  
drukowane.....Data.....

Imię:		<b>Kod materiału:</b>			
Nazwisko:		Data badania:			
Adres:					
Telefon:		Data urodzenia:			
<i>Wywiad ginekologiczny</i>					
Czy pacjentka przyjmowała lub przyjmuje hormonalną terapię zastępczą?			Nie Tak		
PM:		OM:			
Jeśli tak to od kiedy i jakie?					
<i>Badania w kierunku zespołu metabolicznego (MS)</i>					
Obwód pasa:	cm	Waga:	kg	Wzrost:	m
BMI:		% tkanki tłuszczowej:	%	masa tkanki mięśniowej:	
SBP / DBP	mmHg mmHg mmHg	Czy pacjentka przyjmuje leki na nadciśnienie?		Nie Tak	
Jeśli tak to jakie?					
Poziom glikemii	mg/dl	Czy pacjentka przyjmuje leki na obniżenie glikemii?		Nie Tak	
Jeśli tak to jakie?					
Cholesterol cał.	mg/dl	Cholesterol-LDL		mg/dl	
Triglicerydy	mg/dl	Cholesterol-HDL		mg/dl	
Czy pacjentka przyjmuje leki hipolipemiczne?	Nie Tak	Jeśli tak to jakie?			
Czy pacjentka pali papierosy?	Nie Tak	Jeśli tak to od kiedy i w jakich ilościach?		TSH	uU/l
Choroby współistniejące:					
Inne przyjmowane leki:					
		Lekarz badający:			

## Skala oceny objawów menopauzy (Polish version of the MRS)

Które z następujących objawów występują obecnie u Pani? Proszę zaznaczyć odpowiednią kratkę dla każdego objawu. W przypadku objawów, które u Pani nie występują, proszę zaznaczyć „brak”.

### Objawy:

Ocena =	umiarko- wane				
	brak	łagodna	umiarko- wane	poważ- ne	bardzo poważ- ne
	0	1	2	3	4
1. Uderzenia gorąca, pocenie się (epizody pocenia się).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Kłopoty z sercem (zwraca Pani uwagę na bicie serca, nieregularne bicie serca, szybkie bicie serca, ucisk w piersi).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Problemy ze snem (trudności z zasypianiem, trudności z przespaniem całej nocy, wczesne budzenie się).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Nastroj depresyjny (uczucie przygnębienia, smutku, bycie bliskim płaczu, brak motywacji do działania, huśtawka nastrojów).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Drażliwość (uczucie zdenerwowania, wewnętrzny niepokój, uczucie agresji).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Lęk (wewnętrzna nerwowość, uczucie paniki).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Wyczerpanie fizyczne i umysłowe (ogólnie mniejsze możliwości, pogorszenie pamięci, obniżona zdolność koncentracji, zapominanie).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Problemy seksualne (zmiana w pożądaniu seksualnym, seksualnej aktywności i satysfakcji).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Problemy z pęcherzem (trudności z oddawaniem moczu, zwiększona potrzeba oddawania moczu, nietrzymanie moczu).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Suchość pochwy (uczucie suchości lub pieczenia w pochwie, trudności podczas stosunku seksualnego).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. Dyskomfort związany ze stawami i mięśniami (ból stawów, dolegliwości reumatyczne).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## 10. SPIS RYCIN, TABEL I WYKRESÓW ZAMIESZCZONYCH W PRACY

### 10.1 SPIS RYCIN

Rycina 1. Metaboliczne właściwości estrogenów.....	10
Rycina 2. Schematyczny przebieg badania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu z wykorzystaniem platformy MassARRAY (źródło: materiały informacyjne firmy Agena Biosciences).....	18
Rycina 3. Schemat reakcji iPLEX w badaniu z wykorzystaniem platformy Sequenom MassARRAY .....	24
Rycina 4. Przykładowy obraz widma dla 19 wybranych polimorfizmów .....	25
Rycina 5. Polimorfizm rs7774230 w wariantach genotypowych: CT, C oraz T .....	26

### 10.2.SPIS TABEL

Tabela 1. Porównanie kryteriów rozpoznania ZM proponowanych przez różne towarzystwa	8
Tabela 2. Sekwencje starterów użytych do powielenia w drodze PCR wybranych fragmentów genów kodujących ER $\alpha$ i ER $\beta$ .....	19
Tabela 3. Etapy PCR.....	20
Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR z wykorzystaniem platformy Sequenom MassARRAY .....	21
Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej SAP w badaniu z wykorzystaniem platformy Sequenom MassARRAY .....	21
Tabela 6. Dideoksynukleotydy wykorzystane do etapu wydłużania w reakcji iPLEX oraz ich stężenie użyte w reakcji. W sekwencji nukleotydów małymi literami oznaczyłam niespecyficzne zasady dodane w celu „zbilansowania masy” .....	23
Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji iPLEX z wykorzystaniem platformy Sequenom MassARRAY .....	24
Tabela 8. Charakterystyka badanych kobiet (n=147) .....	29
Tabela 9. Charakterystyka kliniczna kobiet spełniających i niespełniających kryteriów rozpoznania ZM.....	30
Tabela 10. Występowanie określonych alleli analizowanych polimorfizmów genu ER $\alpha$ w badanej populacji .....	33
Tabela 11. Występowanie określonych alleli analizowanych polimorfizmów genu ER $\beta$ w badanej populacji .....	33

Tabela 12. Ocena wpływu wybranych polimorfizmów w genie ER $\alpha$ na występowanie ZM wśród badanych kobiet. ....	35
Tabela 13. Ocena wpływu wybranych polimorfizmów w genie ER $\beta$ na występowanie ZM w badanej grupie.....	36
Tabela 14. Iloraz szans (OR) wystąpienia ZM w zależności od posiadania określonych genotypów miejsc polimorficznych genów ER, dla których wykazano istnienie zależności między posiadaniem określonych genotypów a rozwojem ZM.....	37
Tabela 15. Zależność między występowaniem poszczególnych składowych ZM a posiadaniem określonych alleli w trzech występujących wspólnie polimorfizmach rs2234693, rs6902771 oraz rs7774230 genu kodującego ER $\alpha$ .....	38
Tabela 16. Porównanie wskaźników insulinooporności/wrażliwości oraz surowiczych stężeń adiponektyny i CRP wśród kobiet spełniających i niespełniających kryteriów rozpoznania ZM .....	40
Tabela 17. Ocena wpływu występowania określonych alleli w trzech występujących wspólnie miejscach polimorficznych rs2234693, rs6902771 oraz rs7774230 genu kodującego ER $\alpha$ na wskaźniki insulinooporności/wrażliwości, surowicze poziomy adiponektyny oraz CRP .....	41
Tabela 18. Ocena wpływu występowania określonych alleli w miejscu polimorficznym rs3020449 genu kodującego ER $\alpha$ na wskaźniki insulinooporności/wrażliwości, surowicze poziomy adiponektyny oraz CRP w badanej grupie .....	41
Tabela 19. Ocena wpływu występowania określonych alleli w miejscu polimorficznym rs1709183 genu kodującego ER $\alpha$ na skład ciała w badanej grupie .....	43
Tabela 20. Ocena wpływu występowania określonych alleli w trzech występujących wspólnie miejscach polimorficznych rs2234693, rs6902771 oraz rs7774230 genu kodującego ER $\alpha$ na skład ciała w badanej grupie.....	44
Tabela 21. Ocena wpływu występowania określonych alleli w miejscu polimorficznym rs2175898 genu kodującego ER $\alpha$ na skład ciała w badanej grupie .....	44
Tabela 22. Występowanie objawów hipolestrogenemii wśród badanych kobiet.....	45

### 10.3 SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Ilość składowych ZM wśród kobiet spełniających jego kryteria (n=76).....	30
Wykres 2. Występowanie składowych ZM w grupie kobiet spełniających kryteria jego rozpoznania (n=76) .....	31
Wykres 3. Występowanie pojedynczych składowych ZM w grupie kobiet niespełniających kryteriów jego rozpoznania (n=71).....	32

## 11. LITERATURA

- Agnoli C, Gioni S, Sieri S, Sacerdote C, Ricceri F, Tumino R, Frasca G, Pala V, Mattiello A, Chiodini P and others. 2015. Metabolic syndrome and breast cancer risk: a case-cohort study nested in a multicentre Italian cohort. *PLoS one* 10(6):e0128891.
- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC and others. 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120(16):1640-1645.
- Balkau B, Charles MA. 1999. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 16(5):442-443.
- Banerjee S, Chambliss KL, Mineo C, Shaul PW. 2014. Recent insights into non-nuclear actions of estrogen receptor alpha. *Steroids* 81:64-69.
- Binh TQ, Shinka T, Khan NC, Hien VT, Lam NT, Mai IB, Nakano T, Sei M, Yamamoto S, Nakamori M and others. 2006. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms and lifestyle factors with calcaneal quantitative ultrasound and osteoporosis in postmenopausal Vietnamese women. *J Hum Genet* 51(11):1022-1029.
- Boden G. 2011. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18(2):139-143.
- Bonneau GA, Pedrozo WR, Berg G. 2014. Adiponectin and waist circumference as predictors of insulin-resistance in women. *Diabetes & metabolic syndrome* 8(1):3-7.
- Dąbrowska K, Rachoń D. 2013. Hipoestrogenemia pomenopauzalna a rozwój nadciśnienia tętniczego u kobiet po menopauzie. *Choroby Serca i Naczyń* 10(1):16-24.
- Du Clos TW. 2000. Function of C-reactive protein. *Ann Med* 32(4):274-278.
- Dyck DJ. 2009. Adipokines as regulators of muscle metabolism and insulin sensitivity. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 34(3):396-402.
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. 2002. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 287(3):356-359.
- Ford ES, Li C, Zhao G. 2010. Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on a harmonious definition among adults in the US. *J Diabetes* 2(3):180-193.
- Ford ES, Li C, Zhao G, Pearson WS, Mokdad AH. 2008. Prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adolescents using the definition from the International Diabetes Federation. *Diabetes Care* 31(3):587-589.
- Foryst-Ludwig A, Kintscher U. 2010. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122(1-3):74-81.
- Fox CS, Yang Q, Cupples LA, Guo CY, Atwood LD, Murabito JM, Levy D, Mendelsohn ME, Housman DE, Shearman AM. 2005. Sex-specific association between estrogen receptor-alpha gene variation and measures of adiposity: the Framingham Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab* 90(11):6257-6262.
- Gallagher CJ, Langefeld CD, Gordon CJ, Campbell JK, Mychaleckyj JC, Bryer-Ash M, Rich SS, Bowden DW, Sale MM. 2007. Association of the estrogen receptor-alpha gene with the

- metabolic syndrome and its component traits in African-American families: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Diabetes* 56(8):2135-2141.
- Ge YZ, Xu LW, Jia RP, Xu Z, Li WC, Wu R, Liao S, Gao F, Tan SJ, Song Q and others. 2014. Association of polymorphisms in estrogen receptors (ESR1 and ESR2) with male infertility: a meta-analysis and systematic review. *J Assist Reprod Genet* 31(5):601-611.
- Goulart AC, Zee RY, Rexrode KM. 2009. Estrogen receptor 1 gene polymorphisms and decreased risk of obesity in women. *Metabolism: clinical and experimental* 58(6):759-764.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. 2002. Production and actions of estrogens. *The New England journal of medicine* 346(5):340-352.
- Harslof T, Husted LB, Carstens M, Stenkjaer L, Langdahl BL. 2010. Genotypes and haplotypes of the estrogen receptor genes, but not the retinoblastoma-interacting zinc finger protein 1 gene, are associated with osteoporosis. *Calcified tissue international* 87(1):25-35.
- Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB, McDonnell DP, Li X, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng SL, Meyers DA and others. 2002. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation* 105(16):1879-1882.
- Javed S, Ali M, Sadia S, Aslam MA, Masood AI, Shaikh RS, Sayyed AH. 2011. Combined effect of menopause age and genotype on occurrence of breast cancer risk in Pakistani population. *Maturitas* 69(4):377-382.
- Jensen J. 1991. Effects of sex steroids on serum lipids and lipoproteins. *Bailliere's clinical obstetrics and gynaecology* 5(4):867-887.
- Kastorini CM, Panagiotakos DB. 2010. The role of the mediterranean diet on the development of the metabolic syndrome. *Frontiers in bioscience* 2:1320-1333.
- Kim JJ, Pae CU, Kim MR, Min JA, Kim KH, Lee CU, Lee C, Paik IH. 2010. Association between Estrogen Receptor Gene Polymorphisms and Depression in Post-Menopausal Women: A Preliminary Study. *Psychiatry Investig* 7(3):224-227.
- Liu Y, Shi G. 2014. Role of G protein-coupled receptors in control of dendritic cell migration. *Biomed Res Int* 2014:738253.
- Lizcano F, Guzmán G. 2014. Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. *Biomed Res Int* 2014:757461.
- Mauvais-Jarvis F. 2011. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 22(1):24-33.
- Menasce LP, White GR, Harrison CJ, Boyle JM. 1993. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics* 17(1):263-265.
- Mohammadzadeh G, Ghaffari MA. 2014. Additional effect of diabetes mellitus type 2 on the risk of coronary artery disease: role of serum adiponectin. *Iran Red Crescent Med J* 16(1):e8742.
- Mueck AO, Seeger H. 2004. Effect of hormone therapy on BP in normotensive and hypertensive postmenopausal women. *Maturitas* 49(3):189-203.
- Nam HS, Shin MH, Kweon SS, Park KS, Sohn SJ, Rhee JA, Choi JS, Son MH. 2005. Association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal Korean women. *J Bone Miner Metab* 23(1):84-89.



- Ndumele CE, Pradhan AD, Ridker PM. 2006. Interrelationships between inflammation, C-reactive protein, and insulin resistance. *J Cardiometab Syndr* 1(3):190-196.
- Orgaz Gallego MP, Bermejo Lopez P, Tricio Armero MA, Abellan Aleman J, Solera Albero J, Tarraga Lopez PJ. 2015. Metabolic Syndrome and Its Components in Spanish Postmenopausal Women. *Nutricion hospitalaria* 32(n02):656-666.
- Peter I, Shearman AM, Zucker DR, Schmid CH, Demissie S, Cupples LA, Larson MG, Vasan RS, D'Agostino RB, Karas RH and others. 2005. Variation in estrogen-related genes and cross-sectional and longitudinal blood pressure in the Framingham Heart Study. *J Hypertens* 23(12):2193-2200.
- Rachoń D, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W. 2007. Effects of dietary equol on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids, and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Menopause* 14(5):925-932.
- Rachoń D, Teede H. 2010. Ovarian function and obesity--interrelationship, impact on women's reproductive lifespan and treatment options. *Mol Cell Endocrinol* 316(2):172-179.
- Rachoń D, Zdrojewski T, Suchecka-Rachoń K, Szpakowski P, Bandosz P, Manikowski A, Wyrzykowski B. 2004. Knowledge and use of hormone replacement therapy among Polish women: estimates from a nationally representative study--HORTPOL 2002. *Maturitas* 47(1):31-37.
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Pérusse L, Bouchard C. 2006. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 14(4):529-644.
- Resanovic I, Rizzo M, Zafirovic S, Bjelogrljic P, Perovic M, Savic K, Patti AM, Isenovic RE. 2013. Anti-atherogenic effects of 17 $\beta$ -estradiol. *Horm Metab Res* 45(10):701-708.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307(5715):1625-1630.
- Ridker PM. 2007. C-reactive protein and the prediction of cardiovascular events among those at intermediate risk: moving an inflammatory hypothesis toward consensus. *J Am Coll Cardiol*. United States. p 2129-2138.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. 2000. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342(12):836-843.
- Rochira V, Kara E, Carani C. 2015. The endocrine role of estrogens on human male skeleton. *International journal of endocrinology* 2015:165215.
- Sarbijani HM, Khoshnia M, Marjani A. 2015. The association between Metabolic Syndrome and serum levels of adiponectin and high sensitive C reactive protein in Gorgan. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*.
- Schüler S, Lattrich C, Skrzypczak M, Fehm T, Ortmann O, Treeck O. 2014. Polymorphisms in the promoter region of ESR2 gene and susceptibility to ovarian cancer. *Gene* 546(2):283-287.
- Shin A, Kang D, Nishio H, Lee MJ, Park SK, Kim SU, Noh DY, Choe KJ, Ahn SH, Hirvonen A and others. 2003. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 80(1):127-131.
- Siemińska L. 2007. [Adipose tissue. Pathophysiology, distribution, sex differences and the role in inflammation and cancerogenesis]. *Endokrynol Pol* 58(4):330-342.



- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146(2):624-632.
- Toth MJ, Poehlman ET, Matthews DE, Tchernof A, MacCoss MJ. 2001. Effects of estradiol and progesterone on body composition, protein synthesis, and lipoprotein lipase in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(3):E496-501.
- Tsai FJ, Chen WC, Chen HY, Tsai CH. 2003. The ALUI calcitonin receptor gene polymorphism (TT) is associated with low bone mineral density and susceptibility to osteoporosis in postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest* 55(2):82-87.
- Weiderpass E, Persson I, Melhus H, Wedrén S, Kindmark A, Baron JA. 2000. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis* 21(4):623-627.
- Wietlisbach V, Marques-Vidal P, Kuulasmaa K, Karvanen J, Paccaud F, Project WM. 2013. The relation of body mass index and abdominal adiposity with dyslipidemia in 27 general populations of the WHO MONICA Project. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 23(5):432-442.
- Wołk R, Berger P, Lennon RJ, Brilakis ES, Davison DE, Somers VK. 2007. Association between plasma adiponectin levels and unstable coronary syndromes. *Eur Heart J* 28(3):292-298.
- Wyrzykowski B, Zdrojewski T, Bandosz P. 2005a. [Metabolic syndrome in Poland]. *Kardiol Pol* 62 Suppl 2:II30-35.
- Wyrzykowski B, Zdrojewski T, Sygnowska E, Biela U, Drygas W, Tykarski A, Tendera M, Broda G. 2005b. [Epidemiology of metabolic syndrome in Poland. Results of the WOBASZ program]. *Kardiol Pol* 63(6 Suppl 4):S641-644.
- Zhang X, Huang Z, Xie Y, Chen X, Zhang J, Qiu Z, Ma N, Xu G, Liu X. 2015. Lower levels of plasma adiponectin and endothelial progenitor cells are associated with large artery atherosclerotic stroke. *The International journal of neuroscience*.
- Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. 2008. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal* 6:e003.

(58 pozycji)