

lek med. Weronika Greberska

Dysertacja na stopień doktora nauk medycznych

**Ocena występowania polimorfizmów genu  
receptora glikokortykosteroidów u młodych  
kobiet z otyłością i ich korelacja z przebiegiem  
klinicznym choroby**

Promotor: dr hab.n. med. Katarzyna Ziemnicka prof. UM

Miejsce realizacji:

Pracownia Endokrynologii Molekularnej

przy Katedrze i Klinice Endokrynologii,

Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych UM w Poznaniu

Praca została zrealizowana w ramach projektu badawczego KBN/NCN Nr N N402 462939

Poznań 2013

*Serdecznie dziękuję Pani Profesor Katarzynie Ziemnickiej  
za nieocenioną pomoc i wsparcie oraz entuzjazm podczas  
prowadzenia badań*

*Panu dr Bartłomiejowi Budnemu dziękuję za profesjonalną pomoc  
merytoryczną udzielaną w trakcie realizacji projektu naukowego*

*Pani mgr Elżbiecie Wrotkowskiej za cierpliwość i skrupulatność*

*Wszystkim Pracownikom poradni endokrynologicznych, Katedry i  
Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych oraz  
Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki  
oraz Pracowni Endokrynologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego  
w Poznaniu za życzliwość*

*Pracę tę dedykuję Rodzinie*

## Spis Treści

<b>1. Wstęp</b>	<b>- 1</b>
1.1. Otyłość i jej patogeneza	- 1
1.2. Zespół metaboliczny	- 4
1.3. Glikokortykosteroidy - synteza, regulacja wydzielania i funkcja	- 6
1.4. Budowa i funkcja receptora glikokortykosteroidów	- 7
1.5. Polimorfizmy receptora glikokortykosteroidów	- 9
1.5.1. Polimorfizm BclI (rs 41423247)	- 9
1.5.2. Polimorfizm N363S (rs 56149945)	- 10
1.5.3. Polimorfizm ER22/23EK (rs6189/6190)	- 10
1.5.4. Polimorfizm A3669G (rs6198) c.3669A/G	- 11
1.5.5. Polimorfizm D401H	- 12
1.5.6. Polimorfizm TthIII (rs10052957)	- 12
<b>2. Założenia i cel pracy</b>	<b>- 14</b>
<b>3. Grupa badana. Grupa kontrolna. Metodyka badań</b>	<b>- 15</b>
3.1. Grupa badana. Grupa kontrolna.	- 15
3.2. Badania kliniczne i laboratoryjne	- 15
3.2.1. Badanie podmiotowe	- 15
3.2.2. Badanie przedmiotowe	- 16
3.2.3. Badania biochemiczne	- 16
3.2.4. Badania hormonalne	- 17
3.2.5. hsCRP	- 17
3.2.6. Badanie składu masy ciała	- 18
3.2.7. Ocena wskaźnika insulinooporności	- 18
3.2.8. Ocena rezerwy insulinowej	- 18
3.3. Genotypowanie	- 18
3.3.1. Izolacja DNA z zastosowaniem izotiocyanianu guanidyny (GTC)-	18
3.3.2. Ocena jakościowa i ilościowa	- 19
3.3.3. Genotypowanie za pomocą technologii TaqMan	- 19
3.3.4. Genotypowanie przy pomocy technologii HRM	- 21
3.3.5. Bufory do izolacji DNA	- 23
3.3.6. Odczynniki do techniki PCR	- 23
3.4. Analiza statystyczna	- 23

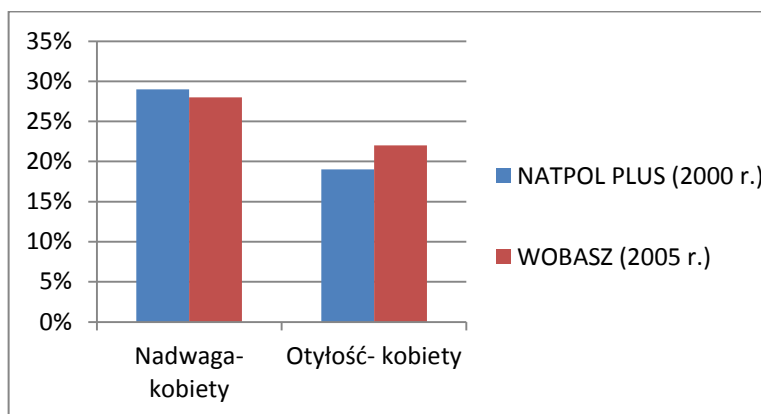
<b>4. Wyniki</b>	<b>- 25</b>
4.1 Analiza występowania poszczególnych polimorfizmów genu GR w grupie badanej i grupie kontrolnej	- 25
4.2 Masa ciała. BMI. Obwód w talii	- 26
4.3 Gospodarka lipidowa	- 31
4.4 Zaburzenia gospodarki węglowodanowej	- 36
4.4.1 Glikemia na czczo oraz w 120 minucie OGTT	- 36
4.4.2 Insulina na czczo, w 2 godzinie OGTT, HOMA-IR oraz rezerwa insulinowa	- 40
4.5 Oś przysadkowo-nadnerczowa- kortyzol poranny godzina 8.00, wieczorny 16.00-18.00 oraz ACTH	- 44
4.6 Białko C-reaktywne	- 47
4.7 Skład masy ciała-tkanka tłuszczowa, zawartość wody pozakomórkowej w organizmie	- 49
4.8 Moment pojawienia się otyłości	- 53
4.9 Zespół policystycznych jajników	- 54
4.10 Ciśnienie tętnicze krwi	- 55
<b>5. Dyskusja</b>	<b>- 56</b>
5.1 Polimorfizm N363S genu GR/NR3C1	- 57
5.2 Polimorfizm BclI	- 60
5.3 Polimorfizm ER22/E23K	- 62
5.4 Polimorfizm A3669G	- 64
5.5 Zespół policystycznych jajników (PCO)	- 64
<b>6. Wnioski</b>	<b>- 66</b>
<b>7. Streszczenie</b>	<b>- 67</b>
<b>8. Piśmiennictwo</b>	<b>- 69</b>
<b>9. Spis rycin i tabel</b>	<b>- 80</b>
<b>10. Abstract</b>	<b>- 84</b>
<b>11. Wykaz norm laboratoryjnych</b>	<b>- 86</b>

## 1. WSTĘP

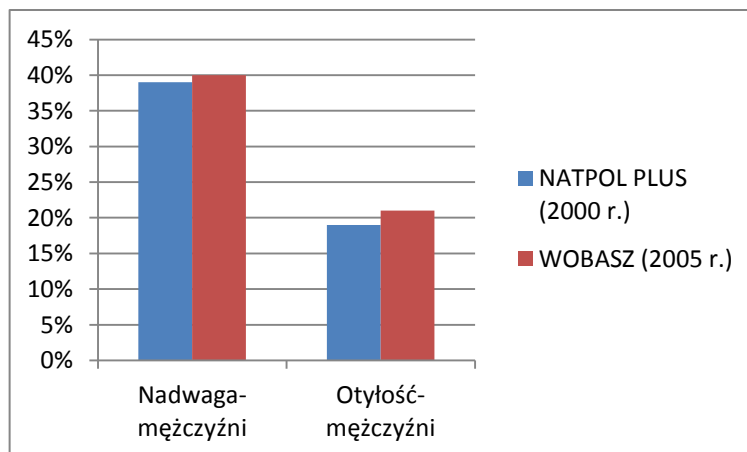
### 1.1. Otyłość i jej patogeneza.

Otyłość jest przewlekłą chorobą metaboliczną o rosnącej częstości występowania i wzbudzającą coraz większe zainteresowanie badaczy. Charakteryzuje się ona nadmiernym nagromadzeniem tkanki tłuszczowej (>15% masy ciała u mężczyzn, >25% masy ciała u kobiet) i wskaźnikiem masy ciała (BMI, ang. *body mass index*) powyżej 30 kg/m<sup>2</sup>. Wyróżnia się otyłość typu brzuszego (centralną) oraz otyłość pośladkowo-udową. Otyłość centralna definiowana jest jako stosunek obwodu talia/biodra u mężczyzn >0,9 a u kobiet > 0,85 [1] lub >80 cm obwodu w talii u Europejki i >94 cm obwodu w talii u Europejczyków [2]. Podział otyłości na brzuszną i pośladkowo-udową ma duże znaczenie kliniczne. Otyłość brzuszna częściej skojarzona jest z zaburzeniami gospodarki lipidowej, węglowodanowej, insulinoopornością, nadciśnieniem tętniczym oraz powikłaniami zakrzepowo- zatorowymi. Natomiast otyłość pośladkowo-udowa częściej kojarzy się z żylakami podudzi oraz ze zwyrodnieniem układu kostno-stawowego kończyn dolnych [3].

Ogólnopolskie badania przeprowadzone w ramach programów: NATPOL PLUS (2000) [4] oraz WOBASZ (2005) [5] wykazały, iż około 60% dorosłych mężczyzn i około 50% kobiet charakteryzuje się zbyt dużą masą ciała (ryc. 1 i 2). Nadwaga dotyczy 39–41% mężczyzn i 28–29% kobiet, natomiast częstość występowania otyłości wynosi odpowiednio 16–21% oraz 19–22%.



**Ryc. 1 Występowanie nadwagi i otyłości u kobiet w Polsce**



**Ryc. 2 Występowanie nadwagi i otyłości u mężczyzn w Polsce**

Otyłość brzuszna prowadzi do poważnych konsekwencji zdrowotnych, min. chorób układu krążenia (nadciśnienie tętnicze, zawał serca, udar mózgu), chorób nowotworowych (gruczolakorak jelita grubego, nowotwór piersi). Ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2 u chorych z otyłością centralną jest nawet dziesięciokrotnie wyższe niż w populacji bez otyłości [6].

Do otyłości prostej prowadzą nieprawidłowe nawyki żywieniowe (słodkie napoje, żywność wysokoprzetworzona, przekąski), mała aktywność fizyczna i problemy emocjonalne (stres, depresja). Powstaje ona wskutek zaburzenia równowagi między ilością energii dostarczonej do organizmu wraz z pożywieniem a przez niego spożytkowanej [7,8,9]. Do rozwoju otyłości przyczynia się wiele leków, min. insulina, pochodne sulfonilomocznika, glikokortykosteroidy, neuroleptyki, leki przeciwdepresyjne. Otyłość jest także składową wielu zespołów endokrynologicznych takich jak: zespół Cushinga, niedoczynność tarczycy, uszkodzenie podwzgórza [10]. Udowodniono również wpływ małej masy urodzeniowej noworodka na rozwój nadmiernej masy ciała w późniejszych okresach życia. Za rozwój otyłości czy też za zwiększoną akumulację tkanki tłuszczowej brzusznej odpowiadają również czynniki genetyczne [11].

Otyłość uwarunkowana jednogennie występuje rzadko. Jak dotąd zidentyfikowano kilka genów odpowiedzialnych za rozwój patologicznej otyłości u dzieci przed pokwitaniem [12]:

- gen leptyny (hormonu produkowanego przez adipocyty i odpowiedzialnego

za zahamowanie wydzielania neuropeptydu Y w podwzgórzu i zmniejszenie apetytu)

- gen kodujący receptor leptyny
- gen proopiomelanokortyny (POMC)
- gen receptora melanokortyny 4

Natomiast otyłość poligenowa występuje częściej [13]. Większość genów, które są związane z rozwojem otyłości choćby przez regulację metabolizmu tkanki tłuszczowej, znajduje się na chromosomie 2, 10, 11 i 20. Do takich genów należą gen  $\beta 2$  i  $\beta 3$ -receptora adrenergicznego, gen TNF $\alpha$ , gen receptora LDL i gen PPAR $\gamma 2$ . Niektóre z tych genów są odpowiedzialne za występowanie otyłości tylko u jednej z płci lub w powiązaniu z czynnikami środowiskowymi.

Mozna także wyróżnić heterogenne pod względem genetycznym zespoły chorobowe przebiegające z otyłością. Należą tu między innymi:

- zespół Bardet-Biedl
- zespół Cohen
- zespół Alström
- zespół Prader-Willi.

W zespołach tych oprócz otyłości występują charakterystyczne cechy fenotypowe, opóźnienie rozwoju psychoruchowego, niepełnosprawność intelektualna oraz zaburzenia w funkcjonowaniu narządów zmysłów. Poligenowa predyspozycja do otyłości uwarunkowana jest przez współistniejący efekt polimorfizmów różnych genów zaangażowanych głównie w metabolizm tkanki tłuszczowej [14].

Niektóre postacie otyłości, szczególnie otyłość brzuszna, wiążą się z pozorną hiperkortyzolemią związaną z nadmierną wrażliwością tkanek obwodowych na kortyzol, mimo utrzymywania się jego poziomu we krwi w granicach wartości referencyjnych [15]. Genem będącym obiektem licznych badań i analiz w ciągu ostatnich kilku lat jest gen receptora glikokortykosteroidów (GR). Związek między polimorfizmami GR a wysokimi wartościami ciśnienia tętniczego, insulinowrażliwością, BMI, zwiększoną ilością brzusznej tkanki tłuszczowej wykazano w wielu publikacjach [16].



## 1.2 Zespół metaboliczny

Zespół metaboliczny został opisany w 1988 r. przez amerykańskiego endokrynologa Geralda Reavena jako zespół powiązanych ze sobą czynników zwiększających ryzyko rozwoju chorób układu sercowo- naczyniowego obejmujących nietolerancję glukozy, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia gospodarki lipidowej (podwyższenie stężenia trójglicerydów, obniżenie stężenia HDL). W patogenezie zespołu przypisał on decydującą rolę insulinooporności oraz hyperinsulinemii [17]. W 1999 r. Światowa Organizacja Zdrowia zaproponowała nową definicję zespołu metabolicznego (Tab. 1).

**Tab. 1 Kryteria rozpoznania zespołu metabolicznego wg WHO (definicja wg WHO, 1999r.).**

Zaburzenia gospodarki węglowodanowej pod postacią cukrzycy typu 2, IGT, IFG lub stwierdzenie insulinooporności oraz stwierdzenie co najmniej dwóch z poniższych:
- WHR >0,9 (M); >0,85 (K) lub BMI $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup>
- Stężenie trójglicerydów $\geq$ 1,7 mmol/l (150mg/dl)
- Stężenie cholesterolu HDL <0,9 mmol/l (35mg/dl) (M); 1,0 mmol/l (40mg/dl) (K)
- Ciśnienie tętnicze $\geq$ 140/90 mm Hg lub stosowanie leków hipotensyjnych
- Wskaźnik wydalania albumin >20 $\mu$ g/min lub wskaźnik albuminuria/kreatynina $\geq$ 30 mg/g
*IFG ( <i>impaired fasting glucose</i> ) – nieprawidłowa glikemia na czczo **IGT ( <i>impaired glucose tolerance</i> ) – nieprawidłowa tolerancja glukozy M – mężczyzna, K – kobieta, WHR – wskaźnik talia–biodra

Ze względu na konieczność stwierdzenia insulinooporności przy użyciu czasochłonnej i skomplikowanej metody klamry metabolicznej oraz określania wydalania albumin z moczem kryteria rozpoznawania zespołu metabolicznego wg WHO w praktyce klinicznej są rzadko stosowane. Powyższa definicja WHO w związku z tym ma obecnie znaczenie historyczne. Za obowiązujące aktualnie i funkcjonujące w piśmiennictwie uważa się kryteria IDF (International Diabetes Federation) oraz zmodyfikowane kryteria NCEP-ATPIII (National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III). Do rozpoznania zespołu

metabolicznego wg zmodyfikowanych kryteriów IDF konieczne jest stwierdzenie co najmniej trzech z poniżej przedstawionych nieprawidłowości:

**Tab. 2. Kryteria rozpoznawania zespołu metabolicznego wg IDF z 2001r. (definicja wg IDF, 2001r.).**

Stwierdzenie co najmniej trzech z poniższych:
Obwód pasa >102 cm (M); >88 cm (K)
Stężenie trójglicerydów $\geq 1,7$ mmol/l (150mg/dl)
Ciśnienie tętnicze $\geq 130/85$ mm Hg
Stężenie cholesterolu HDL <1,0 mmol/l (40mg/dl) (M); <1,3 mmol/l (50mg/dl) (K)
Stężenie glukozy na czczo $\geq 6,1$ mmol/l (110mg/dl)

W 2005r. NCEP-ATPIII zmodyfikowała definicję z 2001r. uwzględniając różnice rasowe w obwodzie talii oraz zmniejszenie progu rozpoznawania nieprawidłowej glikemii na czczo ze 110mg/dl (6,1mmol/l) do 100mg/dl (5,6mmol/l).

**Tab. 3 Kryteria zespołu metabolicznego wg NCEP-ATPIII z 2005r. u Europejczyków.**

Otyłość brzuszna- M $\geq 94$ cm; K $\geq 80$ cm
Oraz dowolne dwa z niżej wymienionych kryteriów:
Stężenie trójglicerydów $\geq 1,7$ mmol/l; ukierunkowane leczenie
Ciśnienie tętnicze $\geq 130/85$ mm Hg; ukierunkowane leczenie
Stężenie cholesterolu HDL <1,03 mmol/l (M); <1,29 mmol/l (K); ukierunkowane leczenie
Stężenie glukozy na czczo $\geq 5,6$ mmol/l (100mg/dl) lub wcześniej rozpoznana cukrzyca

Jednym z czynników sprzyjających rozwojowi zespołu metabolicznego jest hiperkortyzolemia. Glikokortykosteroidy bezpośrednio zwiększają insulinooporność tkanek obwodowych, powodują także, jak to wspomniano wcześniej, nagromadzenie tkanki tłuszczowej na brzuchu, co pogarsza przebieg zespołu metabolicznego [18].

### 1.3 Glikokortykosteroidy - synteza, regulacja wydzielania i funkcja.

Glikokortykosteroidy syntetyzowane są w warstwie pasmowatej kory nadnerczy. Należą do grupy hormonów steroidowych. Wydzielanie glikokortykosteroidów podlega regulacji osi podwzgórze-przysadka-nadnercza. Za regulację uwalniania glikokortykosteroidów są odpowiedzialne hormony podwzgórza (kortykoliberyny - CRH) i przedniego płata przysadki (kortykotropiny – ACTH). Całość nadzoruje ośrodkowy układ nerwowy. Największe stężenie kortyzolu stwierdza się w godzinach rannych, niewielki wzrost jego stężenia około południa, natomiast najmniejsze stężenie występuje w godzinach popołudniowych oraz wieczornych. U osób otyłych stwierdzono zaburzenie pulsacyjnego wydzielania ACTH, zwiększone wydzielanie kortyzolu w testach sekrecyjnych ale jednocześnie zwiększony jego obwodowy obrót, co skutkuje prawidłowym lub nawet zmniejszonym stężeniem kortyzolu w surowicy oraz zaburzeniem profilu dobowego wydzielania tego hormonu [15, 19, 20].

Obwodowy metabolizm kortyzolu podlega regulacji przez dwa enzymy: 11 beta-dehydrogenazę hydroksysteroidową I ( $11\beta$ -HSD I) oraz 11 beta-dehydrogenazę hydroksysteroidowej II ( $11\beta$ -HSD II).  $11\beta$ -HSD II zamienia kortyzol w słabo aktywny metabolicznie kortyzon, natomiast występująca głównie w tkance tłuszczowej, wątrobie i płucach  $11\beta$ -HSD I powoduje konwersję kortyzonu do aktywnej postaci kortyzolu. U osób otyłych stwierdzono zwiększony poziom kortyzolu w tkance tłuszczowej, co wydaje się mieć znaczenie w metabolicznych skutkach otyłości [21]. Glikokortykosteroidy są transportowane we krwi związane z transkortyną i albuminami. Odgrywają one bardzo istotną rolę w regulacji wielu ważnych funkcji organizmu. Glikokortykosteroidy pełnią kluczową rolę w regulacji metabolizmu kwasów tłuszczowych, aminokwasów oraz glukozy a także wpływają na rozmieszczenie tkanki tłuszczowej. Biorą one m.in. udział w utrzymywaniu homeostazy, w regulacji wzrostu i rozwoju komórek [22]. W ostatnich latach coraz częściej podkreśla się rolę wrażliwości na glikokortykosteroidy w rozwoju zespołu metabolicznego [23]. W przypadku hiperkortyzolemii jedną z typowych cech klinicznych jest właśnie akumulacja tkanki tłuszczowej w rejonie brzucha (tzw. otyłość brzuszna), która stanowi jeden z elementów zespołu metabolicznego [24]. U chorych z otyłością brzuszną stężenie kortyzolu we krwi wielokrotnie nie jest podwyższone, a czasami wręcz niskie. Próbuje się zatem wyjaśniać to zjawisko nadmierną produkcją

kortyzolu w obrębie samej tkanki tłuszczowej lub też nadmierną wrażliwością tkanki tłuszczowej na glikokortykosteroidy [25] .

Glikokortykosteroidy wywierają swój metaboliczny wpływ, w większości przypadków, poprzez jądrowy receptor glikokortykosteroidów (GR). Zmiany konformacji i/lub ekspresji receptora mogą w istotny sposób wpływać na jego aktywność. Te zmiany mogą być uwarunkowane genetycznie i warunkują je m.in. polimorfizmy genu GR [26]. Do tej pory opisano kilka polimorfizmów, których obecność wiąże się ze zwiększeniem lub zmniejszeniem wrażliwości tego receptora.

#### **1.4. Budowa i funkcja receptora glikokortykosteroidów**

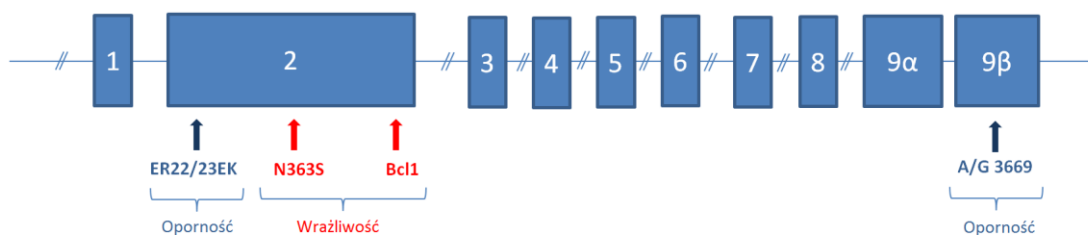
Główną funkcją glikokortykosteroidów jest działanie antyproliferacyjne, które wykorzystywane jest m.in. w leczeniu immunosupresyjnym i przeciwzapalnym. Glikokortykosteroidy wywierają swój wpływ na komórki przez wewnątrzkomórkowy receptor należący do nadrodziny receptorów jądrowych, w budowie którego wyróżnia się trzy domeny:

- a. N-kończową, tzw. immunogenną złożoną z aminokwasów od 1 do 420, która odpowiada za aktywację genów docelowych
- b. środkową, która wiąże DNA, zbudowana jest z aminokwasów 421-488 i zawiera „palce cynkowe” biorące udział w dimeryzacji, translokacji i transaktywacji
- c. domenę C-kończową, obejmującą aminokwasy od 527 do 777, która jest odpowiedzialna za połączenie z ligandem, białkami szoku termicznego, translokację, dimeryzację i transaktywację [27].

Gen receptora glikokortykosteroidowego (NR3C1) zlokalizowany jest na chromosomie 5 (*locus 5q31*). Gen zawiera 9 eksonów [28]:

- ekson 1- obejmuje tzw. sekwencję prowadzącą
- ekson 2 - zawiera sekwencję kodującą dla transaktywacyjnej domeny
- ekson 3 i 4 – kodują tzw. palce cynkowe w domenie wiążącej DNA (DBN, ang. *DNA binding domain*)
- eksony 5,6,7,8 kodują drugą domenę transaktywacyjną oraz część domeny wiążącej ligand (LBD, ang. *ligand binding domain*)
- ekson 9- koduje region 3' nie podlegający transkrypcji oraz pozostałą część domeny LBD warunkującej powstanie 2 izoform GR [29].

Wyróżnia się dwie formy GR, które różnią się odcinkiem C-końcowym: GR $\alpha$  i GR $\beta$ . W przypadku GR $\alpha$  w białku tym po identycznych aminokwasach do pozycji 727 znajduje się dalej jeszcze 50 innych aminokwasów, a w przypadku GR $\beta$  15 aminokwasów, co stanowi o różnicy pomiędzy tymi dwoma izoformami. GR $\alpha$  to forma dominująca, natomiast GR $\beta$  oddziałuje jak inhibitor aktywności GR $\alpha$ . Receptor w cytoplazmie tworzy heterodimerski kompleks z białkami szoku termicznego (ang. hsp, *heat shock protein*) pozostając w ten sposób w formie nieaktywnej. Po połączeniu z ligandem dochodzi do odłączenia białek szoku termicznego i receptor w formie homodimeru transportowany jest przez pory jądrowe do jądra komórkowego. Taki kompleks może oddziaływać na geny w różny sposób, może np. inicjować transkrypcję poszczególnych genów docelowych przez połączenie z regionem promotorowym tzw. *GC-responsive element*. Może również wpływać na transkrypcję poprzez bezpośrednie oddziaływania pomiędzy białkami [29, 30]. Schematyczną budowę genu GR przedstawiono na rycinie 3.



**Ryc. 3 Schemat budowy genu receptora glikokortykosteroidów (GR/N3CR1)**  
**Źródło: Walker Brian R Glucocorticoids and Cardiovascular Disease Eur J Endocrinol November 1, 2007 157 545-559**

Różnorodność w budowie receptora glikokortykosteroidów wynikająca ze zmian w genie GR związana jest z odmiennym osobniczo wpływem na poszczególne procesy biologiczne, min. wpływem na oś podwzgórze–przysadka-nadnercza czy na odpowiedź na GC w tkankach. Wykazano, iż niektóre mutacje czy też polimorfizmy w obrębie genu GR prowadzą do zwiększonego ryzyka sercowo-naczyniowego, zaburzeń metabolicznych czy wystąpienia procesów rozrostowych w obrębie układu krwiotwórczego [31,32,33]. Schemat budowy receptora GR przedstawiono na rycinie 4.



**Ryc. 4 Schemat budowy receptora GR. Źródło: Zhou J, Cidlowski JA (2005)**  
**NTD- ang. amino terminal domain, domena N-końcowa, zwana również AF-1,**  
**DBD- ang. DNA binding domain, zawiera „palce cynkowe” oraz tzw. region H ,**  
**ang. Hinge region, LBD- ang. ligand binding domain, zawiera tzw. AF-2**  
**domenę.**

## 1.5. Polimorfizmy receptora glikokortykosteroidów

### 1.5.1 Polimorfizm BclI (rs 41423247)

Jak dotąd opisano kilka polimorfizmów receptora glikokortykosteroidów. Jednym z nich jest polimorfizm BclI (tzw. polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych wykrywany przy zastosowaniu enzymu restrykcyjnego BclI) ostatnio opisywany jako zmiana C→G. Używając techniki *Southern blotting* zidentyfikowano dwa transkrypty o długości 4,5 i 2,3 kb. W wielu badaniach wykazano jego związek z otyłością brzuszną, insulinoopornością i niekorzystnym profilem lipidowym. U kobiet będących homozygotycznymi nosicielkami fragmentu 4,5 kb obserwowano wyższe poziomy insuliny na czczo oraz wyższe wartości współczynnika HOMA. Ponadto wykazano obecność transkryptu 4,5 kb u osób genetycznie predysponowanych do nadciśnienia tętniczego [34,35,36,37]. Heterozygotyczni nosiciele tego allelu, szczególnie kobiety, wykazują większe predyspozycje do gromadzenia tkanki tłuszczowej z wiekiem [38].

Syed i wsp. w swojej pracy wysunęli podejrzenie, iż polimorfizm BclI jest związany z nadmierną wrażliwością na glikokortykosteroidy, z hiperinsulinemią oraz insulinoopornością tylko w obecności innego polimorfizmu – rs2918419. Polimorfizm ten zlokalizowany jest w intronie 2 w bliskim sąsiedztwie polimorfizmu BclI i polega na zamianie tyminy na cytozynę w łańcuchu DNA [39].

### **1.5.2 Polimorfizm N363S (rs 56149945)**

Polimorfizm N363S był obiektem największej ilości badań. Polega na zamianie adeniny na guaninę w kodonie 363, w eksonie 2 genu GR, co skutkuje zastąpieniem asparaginy seryną w białku receptora. Domena N-końcowa receptora GS moduluje aktywację transkrypcyjną. Hiperfosforylacja seryny może wzmacniać ekspresję genu receptora glikokortykosteroidów. W jednym z pierwszych doniesień wykazano, iż polimorfizm ten wiąże się z większą wrażliwością na glikokortykosteroidy po podaniu małej dawki deksametazonu 0,25mg. Ponadto jego heterozygotyczni nosiciele mają większy indeks masy ciała niż osoby, u których nie stwierdzono tego polimorfizmu [40], a osoby otyłe wykazują tendencję w kierunku rozwoju otyłości olbrzymiej. W kolejnych 2 badaniach Australijskich udowodniono związek między polimorfizmem N363S a zwiększonym BMI [41,42]. Ponadto Lin wykazał obecność allelu N363S u 15% ludzi z rozpoznaną chorobą wieńcową w porównaniu do 4% występowania w populacji osób zdrowych. Poza tym związek ten był większy w populacji osób z niestabilną chorobą wieńcową [43].

Z kolei Dobson i wsp. wykazali związek polimorfizmu N363S ze wskaźnikiem WHR, natomiast nie wykazali jego korelacji z BMI, ciśnieniem tętniczym krwi i poziomem cholesterolu [44]. W badaniach szwedzkich i duńskich nie wykazano związku polimorfizmu N363S z otyłością [45,46]. Nosiciele dwóch polimorfizmów receptora glikokortykosteroidowego N363S oraz Bcl11 wykazują tendencję w kierunku niekorzystnego profilu sercowo-naczyniowego. Częstość występowania polimorfizmu N363S waha się od 0,7% w populacji osób zamieszkujących południową Azję [47] do około 27% u Australijczyków [48].

### **1.5.3 Polimorfizm ER22/23EK (rs6189/6190)**

Polimorfizm ER22/23EK polega na obecności dwóch zmian w kodonie 22 i 23. Ze względu na bliskie położenie tych zmian polimorfizmy te (SNPs w kodonie 22 i 23) badane są jako jeden polimorfizm połączony. Sekwencja zmian w łańcuchu DNA wygląda w sposób następujący:  $GAG\ AGG \rightarrow GAA\ AAG$ . Pierwsza zamiana jest niema, gdyż obie trójki kodują kwas glutaminowy. Natomiast druga wiąże się z zastąpieniem argininy lizyną. Powoduje to zmniejszoną aktywność transkrypcyjną oraz zmniejszoną ekspresję genu receptora GS.

Yudt and Cidlowski w swojej pracy wykazali, iż są co najmniej dwa warianty translacyjne receptora glikokortykosteroidów: GR- $\alpha$ A oraz GR- $\alpha$ B [49]. Odkryto, iż polimorfizm ten ułatwia ekspresję wariantu GR- $\alpha$ A, natomiast nie wpływa na GR- $\alpha$ B. Izoforma GR- $\alpha$ A jest mniej aktywna niż GR- $\alpha$ B, co powoduje oporność na GS. Polimorfizm ten wiąże się ze zwiększoną ekspresją formy A, mniejszą aktywnością transkrypcyjną formy B, większą koncentracją wewnątrzkomórkową mniej aktywnej formy A, co może stanowić jeden z mechanizmów oporności na glikokortykosteroidy u nosicieli polimorfizmu ER 22/23EK [50].

W przeciwieństwie do wyżej opisanych polimorfizmów nosiciele ER22/23EK charakteryzowali się niższymi wartościami całkowitego cholesterolu i cholesterolu LDL, niższym stężeniem insuliny na czczo oraz mniejszą insulinoopornością. Ponadto osoby starsze będące nosicielami genu miały mniejsze ryzyko demencji. W związku z tym, iż GS warunkują uzależnione od płci rozmieszczenie tkanki tłuszczowej analizie poddano również jej dystrybucję u młodych osób. Okazało się, że mężczyźni nosiciele polimorfizmu ER22/23EK byli smuklejsi, mieli więcej masy mięśniowej w porównaniu z osobami, u których nie wykazano tego polimorfizmu [51]. Z kolei u kobiet nosicielek stwierdzono tendencję do mniejszej masy ciała, mniejszego obwodu w talii i biodrach.

Glikokortykosteroidy są hormonami zaangażowanymi w reakcje zapalne oraz autoimmunologiczne w ustroju, jak również są szeroko stosowane w leczeniu. W związku z tym były one przedmiotem wielu badań w chorobach reumatoidalnych, czy zapalnych przewodu pokarmowego. W pracy van Winsen i wsp. wykazano związek polimorfizmu ER22/23EK z bardziej niekorzystnym przebiegiem twardziny układowej [52].

Z kolei oporność na GS warunkowana tym polimorfizmem wiąże się z mniejszym ryzykiem otępienia, wolniejszą utratą funkcji poznawczych [53].

#### **1.5.4. Polimorfizm A3669G (rs6198) c.3669A/G**

Zlokalizowany jest w eksonie 9  $\beta$ . Powoduje zwiększoną ekspresję wariantu GR- $\beta$ , zwiększoną stabilność GR- $\beta$  mRNA, co prowadzi do zmniejszonej aktywności transkrypcyjnej GR- $\alpha$ . Istnieją dowody, iż zwiększona ekspresja GR- $\beta$  powoduje zmniejszoną aktywność transkrypcyjną GR- $\alpha$ , wywołując oporność na glikokortykosteroidy [54, 55, 56, 57, 58, 59]. Obecność tego polimorfizmu związana



jest z podwyższonymi parametrami zapalnymi, skłonnością do chorób sercowo-naczyniowych, pomimo bardziej korzystnego profilu lipidowego u mężczyzn i składu ciała u kobiet [60, 61]. W pracy włoskich badaczy wykazano, iż polimorfizm A3669G pełni ochronną rolę u pacjentów z zespołem Cushinga. Udowodniono zmniejszoną częstość występowania cukrzycy typu 2 pomimo utrzymującego się podwyższonego stężenia kortyzolu zarówno w godzinach rannych jak i o północy [62]. Badano również związek tego polimorfizmu (wraz z dwoma innymi: rs6191 i rs33388) z występowaniem depresji i występowaniem objawów depresji w chorobie dwubiegunowej stwierdzając możliwość modyfikacji przebiegu obu zaburzeń u chorych obarczonych tymi polimorfizmami [63].

#### **1.5.5. Polimorfizm D401H (rs142693717)**

Zlokalizowany jest w eksonie 2. Polega na substytucji kwasu asparaginowego histydyną w pozycji 401 receptora GS. Mutacja ta powoduje zwiększoną transaktywację izoformy GR- $\alpha$  w genie GR, natomiast nie wpływa na powinowactwo receptora do ligandu, translokację kompleksu receptor- ligand do jądra komórkowego, zdolność do łączenia się z DNA. Zwiększona aktywność transkrypcyjna GR- $\alpha$  predysponuje do zwiększonej wrażliwości na GS. Skutkuje to niekorzystnym profilem metabolicznym, zwiększoną skłonnością do otyłości brzusznej, zaburzeń lipidowych, nadciśnienia tętniczego, chorób sercowo-naczyniowych o podłożu miażdżycowym [64].

#### **1.5.6. Polimorfizm *TthIII* (rs10052957)**

Polimorfizm ten zlokalizowany jest w eksonie 2 i polega na zamianie cytozyny na tyminę w pozycji 3807 łańcucha DNA. Polimorfizm ten wydaje się być powiązany z drugim polimorfizmem ER22/23EK. Wydaje się, że współwystępowanie obu polimorfizmów wiąże się ze zmniejszoną wrażliwością na GS. Z kolei obecność tylko jednego z nich- *TthIII* nie wpływa na wrażliwość/oporność tkanek na glikokortykosteroidy [65]. Polimorfizm ten był obiektem badań w afektywnej chorobie jednobiegunowej oraz w depresji [66].

Istnieje wiele innych polimorfizmów genu GR, których obecność może modyfikować przebieg różnych chorób i reakcje na ich leczenie [67]. Jednak

przeprowadzone do tej pory badania wykazują różnice pomiędzy populacjami wskazujące na znaczenie bądź brak znaczenia tych polimorfizmów dla rozwoju i przebiegu różnych chorób, w tym otyłości i zespołu metabolicznego [40, 41, 45, 46].

## **2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY**

### **Założenia pracy:**

Od kilku lat polimorfizmy genu receptora glikokortykosteroidów GR/NR3C1 są obiektem licznych badań w odniesieniu do rozwoju otyłości, nadciśnienia tętniczego czy chorób sercowo- naczyniowych. Istnieją różne warianty tego genu, co może mieć wpływ na nadmierną wrażliwość lub oporność receptora na glikokortykosteroidy. Nie istnieją jednak jednoznaczne dane co do udziału poszczególnych polimorfizmów w rozwoju wymienionych chorób i tego typu predyspozycja do otyłości czy nadciśnienia tętniczego jest różna w zależności od populacji.

### **Celem pracy była:**

1. Ocena częstości występowania polimorfizmów genu GR zwiększających wrażliwość receptora GR: N363S, BclI oraz polimorfizmów zmniejszających jego wrażliwość na steroidy: ER22/23EK oraz A3669G w populacji otyłych kobiet w wieku 20-45 lat.
2. Powiązanie występujących polimorfizmów z wybranymi składowymi zespołu metabolicznego.

Praca badawcza była finansowana w ramach funduszy projektu promotorskiego (KBN/NCN) nr N N402 462939.

### **3. GRUPA BADANA. GRUPA KONTROLNA. METODYKA BADAŃ.**

#### **3.1 Grupa badana. Grupa kontrolna.**

Badanie przeprowadzono w grupie 2 kobiet z regionu Wielkopolski w wieku 20-45 lat z różnym wskaźnikiem masy ciała:

- 106 kobiet z BMI powyżej 30 kg/m<sup>2</sup>- grupa badana (średnia wieku 30,8+/- 6,6)
- 101 kobiet z BMI poniżej 30 kg/m<sup>2</sup>- grupa kontrolna (średnia wieku 29,8 +/- 5,9)

Zgodę na przeprowadzenie badań wyraziła Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu – nr decyzji 934/09. Do badań zakwalifikowano osoby, które świadomie wyraziły na nie zgodę. Badania przeprowadzane były u pacjentek będących pod opieką poradni endokrynologicznych, Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych oraz Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. U tych chorych przeprowadzono: badanie podmiotowe i przedmiotowe, badania biochemiczne krwi (ocena gospodarki węglowodanowej, lipidowej), badania hormonalne, badania składu masy ciała oraz badania genetyczne.

#### **3.2 Badania kliniczne i laboratoryjne**

##### **3.2.1 Badanie podmiotowe**

Podczas badania podmiotowego oceniano moment pojawienia się nadmiernej masy ciała, przebieg zaburzenia. Uwzględniono wywiad osobniczy oraz rodzinny w kierunku otyłości, zaburzeń gospodarki lipidowej, węglowodanowej, zaburzeń czynności tarczycy.

### **3.2.2 Badanie przedmiotowe**

W trakcie hospitalizacji przeprowadzono pomiary antropometryczne - masa ciała, wzrost, obwód talii, obliczono BMI oraz WHR. Dokonano pomiaru ciśnienia tętniczego krwi na prawym ramieniu w pozycji siedzącej.

U każdej pacjentki wykonano badanie ultrasonograficzne głowicą dopochwową z oceną jajników pod kątem zespołu policystycznych jajników oraz przeprowadzono konsultację ginekologiczną. Zespół policystycznych jajników rozpoznawano na podstawie obrazu jajników w badaniu ultrasonograficznym, klinicznych wykładników androgenizacji lub też stwierdzenia w wywiadzie braku miesiączki, rzadkiego jej występowania (kryteria Europejskiego Towarzystwa Płodności (ESHRE, ang. European Society of Human Reproduction) oraz Amerykańskiego Towarzystwa Medycyny Reprodukcyjnej (ASRM, ang. American Society of Reproductive Medicine).

### **3.2.3 Badania biochemiczne**

Badania biochemiczne krwi wykonano w Centralnym Laboratorium Analityczno-Biochemicznym Szpitala Klinicznego im. Heliodora Świącickiego w Poznaniu w trakcie rutynowego pobytu chorych w oddziałach klinicznych.

Dokonano oceny następujących parametrów biochemicznych krwi:

- stężenie elektrolitów (sód, potas), kreatyniny, aminotransferaz - alaninowej oraz asparaginianowej w surowicy krwi
- glukoza i insulina w teście doustnego obciążenia 75g glukozy u wszystkich pacjentek bez wywiadu w kierunku cukrzycy; pomiarów stężeń glukozy oraz insuliny dokonywano na czczo oraz 2 godziny po obciążeniu
- ocena rezerwy insulinowej - rezerwę insulinową wysp beta trzustki oceniano analizując różnicę w stężeniu insuliny w teście obciążenia glukozą przed i po 120 minutach od podania glukozy
- profil lipidowy z oznaczeniem całkowitego cholesterolu, frakcji LDL oraz HDL, trójglicerydów (TG). Oceniano także stosunek TG/HDL przyjmując za graniczną wartość prawidłową 2,5.

### 3.2.4 Badania hormonalne

Badania hormonalne wykonano w Centralnym Laboratorium Analityczno-Biochemicznym Szpitala Klinicznego im. H Świącickiego w Poznaniu oraz w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych UM w Poznaniu:

Wykonano następujące badania hormonalne:

- Tyreotropina -TSH
- Prolaktyna- PRL
- Estradiol
- Gonadotropiny – LH i FSH
- Testosteron, DHEA-S
- Adrenokortykotropina - ACTH (przy użyciu testu immunoradiometrycznego - zestaw do ilościowego oznaczania ACTH Thermo Scientific firmy BRAHMS)
- stężenie kortyzolu na czczo o godzinie 8.00 oraz w godzinach popołudniowych między godziną 16.00 a 18.00
- dobowe wydalanie kortyzolu z moczem
- test hamowania 1mg deksametazonu – podanie deksametazonu o 23.00 i ocena stężenia kortyzolu i ACTH o godz. 8.00 rano na czczo.

Większość badań przeprowadzono metodą ECLIA przy użyciu aparatu COBAS 6000. Wartości norm laboratoryjnych dla poszczególnych oznaczeń hormonalnych umieszczono w załączniku nr 1.

Badania LH, FSH, estradiolu, testosteronu i DHEA-S zostały wykorzystane tylko do konsultacji pacjentek dokonanej przez ginekologa-endokrynologa.

### 3.2.5 hsCRP

Badanie hsCRP wykonano w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Katedry i Kliniki Endokrynologii Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych w Poznaniu. Stężenie hsCRP oznaczono metodą ELISA przy użyciu gotowych zestawów firmy DRG®.

Minimalna wartość hsCRP wykrywana powyższym testem wynosiła 0,1mg/l, natomiast wartość maksymalna 10mg/dl.

### **3.2.6 Badanie składu masy ciała**

Analizę składu ciała z pomiarem całkowitej zawartości wody w organizmie, masy tłuszczowej, beztłuszczowej oraz mięśniowej wykonano przy użyciu analizatora BODYGRAM (*qualitative and quantitative body composition analysis*) firmy TANITA.

### **3.2.7 Ocena wskaźnika insulinooporności**

Ocenę wskaźnika insulinooporności HOMA-IR dokonano wg następującego wzoru:

HOMA-IR= Glukoza x Insulina/405 (glukoza w mg/d; insulina w  $\mu$ U/ml)

### **3.2.8 Ocena rezerwy insulinowej.**

Rezerwę insulinową wysp beta trzustki oceniano analizując różnicę w stężeniu insuliny w teście obciążenia glukozą przed i po 120 minutach od podania glukozy.

## **3.3 Genotypowanie**

### **3.3.1 Izolacja DNA z zastosowaniem izotiocyjanianu guanidyny (GTC)**

W pierwszym etapie do 2-10 ml krwi obwodowej EDTA dodawano 25 ml buforu do lizy, mieszano oraz inkubowano przez 30 min w temp 0<sup>0</sup>C. Materiał odwirowano w wirówce Solvall RT 6000B, 2500 rpm przez 15 minut w temperaturze 4<sup>0</sup>C. Po odrzuceniu supernatantu osad zawieszono w 500  $\mu$ l buforu do lizy, następnie dodano 2 ml GTC dokładnie mieszając. Po 15 minutowej inkubacji w 0<sup>0</sup>C dodano 2,5 ml mieszaniny fenol-chloroform-alkohol izoamyłowy i dokładnie wymieszano. W kolejnym etapie materiał wirowano i zebrano supernatant, następnie po raz kolejny dodano 2,5ml chloroformu, ponownie odwirowano i zebrano supernatant. DNA precypitowano 5ml etanolu (-20<sup>0</sup>C). Zebrany osad przemyto 1 ml 75% etanolu i

suszono w temperaturze pokojowej. Tak uzyskany preparat DNA rozpuszczono w 300µl sterylnej wody.

### 3.3.2 Ocena jakościowa i ilościowa

Wyizolowane DNA poddano ocenie jakościowej oraz ilościowej. Przy użyciu markera służącego do oceny ilościowej (HyperLadder II, Biorline) przeprowadzono elektroforezę w żelu agarozowym z bromkiem etydyny oraz w buforze TAE. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez 3 godziny przy użyciu prądu o napięciu 40V i oceniano w świetle UV wykorzystując system dokumentacji żelu (Maestrogen). Stężenie rozpuszczonego w wodzie DNA oceniano fluorymetrem Qbit (Invitrogen) za pomocą dedykowanych zestawów odczynnikowych.

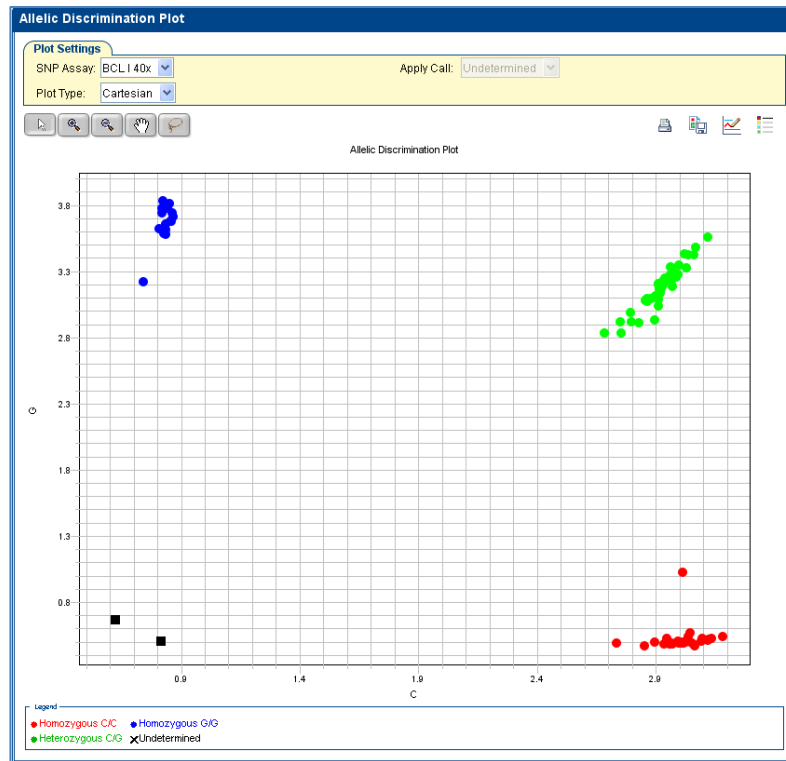
### 3.3.3 Genotypowanie za pomocą technologii TaqMan

Do genotypowania wykorzystano technologię TaqMan® (Applied Biosystems) do analizy markerów SNP. Specyficzne allele w genotypie badanych osób zidentyfikowano przy użyciu testów zawierających:

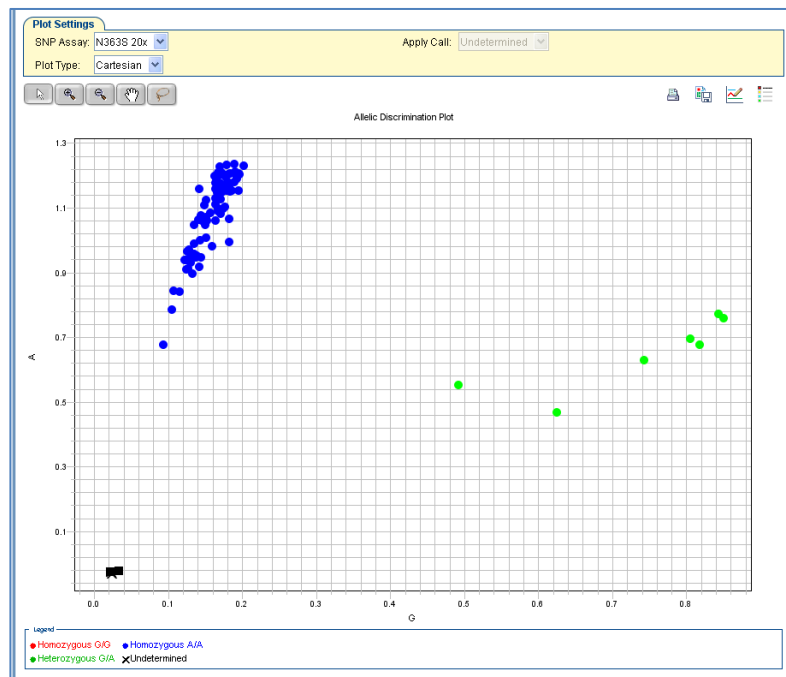
- 2 sondy typu TaqMan® znakowane fluorochromem VIC i FAM. Sondy zawierają na końcu 5' fluorochrom, natomiast na końcu 3' tzw. cząsteczkę wygaszającą
- startery pozwalające na powielenie sekwencji DNA zawierającej dany marker SNP.

Podczas reakcji hybrydyzacji sondy wiążą się specyficznie z DNA matrycy. W technologii wykorzystuje się aktywność egzonukleazową polimerazy, w związku z czym w przypadku całkowitego dopasowania sondy do matrycy polimeraza wycina i niszczy napotkaną sondę. Powoduje to oddzielenie fluorochromu od wygaszacza i emisję sygnału. Świadczy to o obecności specyficznego allele. Natomiast w przypadku połączenia się sondy z allelem alternatywnym powstaje niedopasowanie jednego nukleotydu (tzw. *mismatch*), polimeraza usuwa ją, lecz nie degraduje. Fluorochrom na końcu 5' pozostaje w sąsiedztwie cząsteczki wygaszającej i nie dochodzi do emisji sygnału. Obecność sygnału od jednej sondy świadczy o homozygotyczności, natomiast obydwu – heterozygotyczności markera SNP. Rycina 5 przedstawia przykładowy chromatogram odczytu dla polimorfizmu BclI, natomiast rycina 6 przykładowy chromatogram odczytu dla polimorfizmu N363S.





**Ryc. 5 Chromatogram odczytu dla polimorfizmu BclI. Kolorem niebieskim przedstawiono homozygoty GG, czerwonym- homozygoty CC, zielonym- heterozygoty CG. Kolor czarny- kontrole negatywne.**



**Ryc. 6 Chromatogram odczytu dla polimorfizmu N363S. Kolorem niebieskim przedstawiono homozygoty AA, zielonym- heterozygoty AG. Kolor czarny- kontrole negatywne. Zwraca uwagę bark obecności homozygot GG w badanej populacji**

### 3.3.4 Genotypowanie przy pomocy technologii HRM (*High resolution melting analysis*)

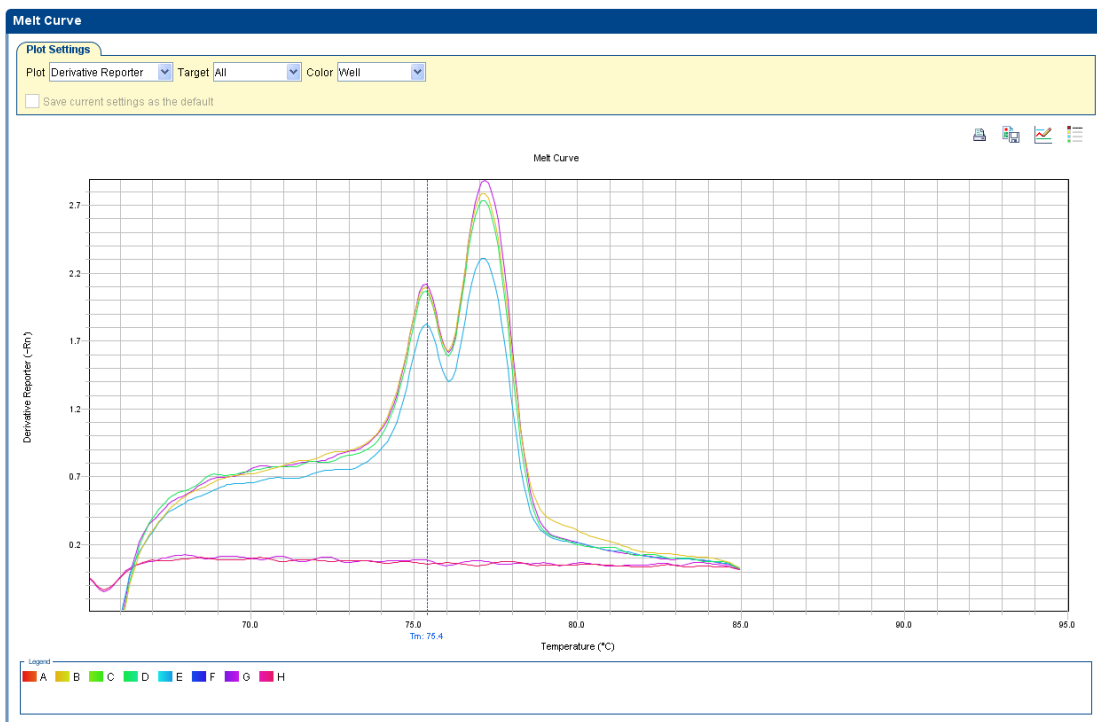
Próbki DNA poddano standardowej amplifikacji za pomocą techniki PCR. Następnie przeprowadzono reakcję HRM wg następującego schematu:

- denaturacja w temperaturze 95 stopni przez 10 sekund
- renaturacja w temperaturze 56 stopni przez 60 sekund
- topnienie w temperaturze 70-90 stopni

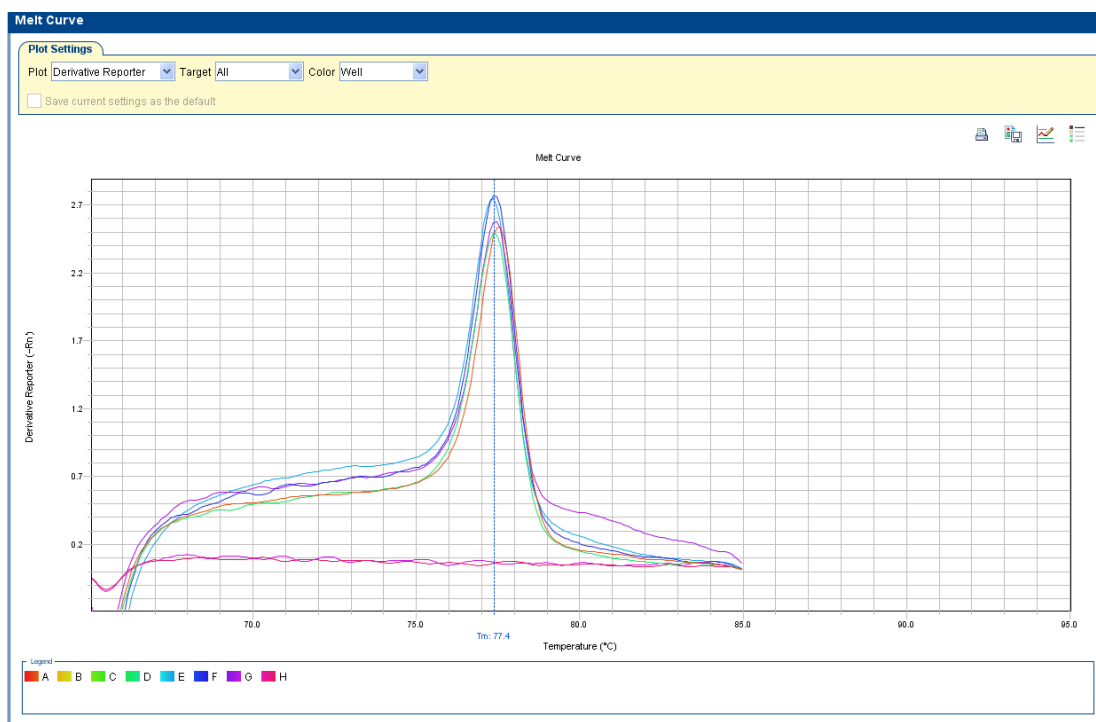
Do reakcji PCR wykorzystano:

- 10ng matrycowego DNA
- 2mM MgCl<sub>2</sub>
- 500nM starterów
- 200 $\mu$ M dNTPs
- bufor PCR
- 0,5U polimerazy DNA (HotStartTaq polymerase)
- 5% DMSO
- woda destylowana
- fluorochrom SYTO® 9
- 

Rycina 7 i 8 przedstawia krzywe topnienia dla polimorfizmu ER22/E23K.



**Ryc. 7 Schemat krzywej topnienia przy oznaczaniu polimorfizmu genu receptora glikokortykosteroidów ER22/23EK- heterozygota AG.**



**Ryc. 8 Schemat krzywej topnienia przy oznaczaniu polimorfizmu genu receptora glikokortykosteroidów ER22/23EK- homozygota GG.**

### 3.3.5 Bufory do izolacji DNA

Bufor do lizy (pH 7,4)

8,28g NH<sub>4</sub>Cl

1g KHCO<sub>3</sub>

0,034g EDTA

Bufor do lizy - roztwór GTC (pH 7,0)

47,26 g GTC

0,735g cytrynianu sodu

0,5g sarkosyl

0,78ml 2-merkaptoetanol

### 3.3.6 Odczynniki do techniki PCR

Reakcję PCR prowadzono z zastosowaniem następujących odczynników:

Polimeraza Taq

FailSafe Premix J 2x (bufor)

dNTP

(PRODUCENCI – Roche, Applied Biosystems , Novazym, Epicentre)

### 3.4. Analiza statystyczna

Parametry mierzalne opisano średnią arytmetyczną, odchyleniem standardowym, pomiarem minimalnym i maksymalnym dla każdego polimorfizmu w każdej z grup heterozygoty i homozygoty. Sprawdzone zgodność z rozkładem normalnym ww. parametrów testem Shapiro-Wilka. Gdy zgodność z rozkładem normalnym została potwierdzona do porównania dwu grup zastosowano test t-Studenta (dla homogenicznych wariacji) lub test Welcha (dla heterogenicznych wariacji). Do porównania trzech grup zastosowano analizą wariacji ANOVA, gdy wariacje były homogeniczne. Homogeniczność wariacji badano testem Levena. Gdy nie potwierdzono zgodności z rozkładem normalnym, zastosowano testy

nieparametryczne. Do porównania dwóch grup test Manna-Whitneya, do porównania trzech grup test Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna.

Wyznaczono również model regresji logistycznej metodą quasi-Newtona w celu wyznaczenia ilorazów szans z przedziałami ufności.

Parametry kategoryjne opisano liczebnością i odpowiadającą wartością procentową. Zastosowano dla tabel o wymiarowości 2 na 2 test  $\chi^2$  z poprawką Yatesa lub test dokładny Fishera. Dla tabel o większej wymiarowości zastosowano test  $\chi^2$  lub test dokładny Fishera-Freemana-Haltona.

Przyjęto poziom istotności  $p=0,05$ . Obliczenia wykonano przy pomocy pakietu statystycznego STATISTICA v10 i StatXact-8.

#### 4. WYNIKI

##### 4.1 Analiza występowania poszczególnych polimorfizmów genu GR w grupie badanej i grupie kontrolnej

Analizowano częstość występowania polimorfizmów N363S, BclI, ER22/E23K oraz A3669G genu GR w grupie badanej i grupie kontrolnej. Nie wykazano różnicy w częstości występowania polimorfizmów genu GR w grupie badanej i grupie kontrolnej. Szczegółowe dane przedstawione są w tabeli nr 4.

**Tab. 4 Częstości występowania polimorfizmów genu receptora glikokortykosteroidów w grupie badanej i grupie kontrolnej. Wartości p pochodzą z testu Fisher-Freeman-Halton'a.**

Polimorfizmy genu <i>GR/NR3C1</i>		Częstość występowania N (%)		P
		Grupa badana	Grupa kontrolna	
N363S	AA	95 (89,6%)	93 (92,1%)	0.6333
	AG	11 (10,4%)	8 (7,9%)	
	GG	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
BclI	CC	27 (25,5%)	32 (31,7%)	0.0863
	CG	64 (60,4%)	46 (45,5%)	
	GG	15 (14,1%)	23 (22,8%)	
ER22/23EK	GG	99 (93,4%)	98 (97,0%)	0.3331
	GA	7 (6,6%)	3 (3,0%)	
	AA	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
A3669G	AA	71 (67,0%)	67 (66,3%)	0.9748
	AG	26 (24,5%)	26 (25,7%)	
	GG	9 (8,5%)	8 (8,0%)	

Analizie poddano częstość występowania polimorfizmów w populacji badanej. Nie wykazano odstępstw w rozkładzie alleli w populacji i zaburzenia równowagi Hardy'ego - Weinberga. Szczegółowe dane przedstawiono w tab. 5.

**Tab. 5 Częstość polimorfizmów rzadkich w grupie badanej - MAF (ang. minor allele frequency)**

	<b>MAF</b>
N363S	0,05
BclI	0,44
ER 22/23 EK	0,03
A3669G	0,21

Częstości występowania polimorfizmów genu *GR* nie odbiegają od częstości opisanych dla innych populacji.

#### **4.2 Masa ciała. BMI. Obwód w talii.**

Wartości średnie, minimalne i maksymalne masy ciała, BMI oraz obwodu w talii w badanej grupie podano w tabeli 6. Założeniem badawczym było również wykonanie u większości pacjentek oceny wskaźnika talia/biodro (WHR). Jednak ze względu na to, że badania wykonywano na różnych oddziałach nie udało się zgromadzić pełnych danych na temat WHR u wszystkich chorych, stąd tego parametru nie włączono do analizy statystycznej. U 47 chorych rozpoznano zespół metaboliczny wg kryteriów IDF z 2005 roku.

**Tab. 6 Wartości średnie  $\pm$  SD, minimalne i maksymalne masy ciała, BMI oraz obwodu w talii w badanej grupie. BMI – wskaźnik masy ciała**

<b>N=106</b>	<b>Średnie</b>	<b>Odchylenie standardowe</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>Masa ciała [kg]</b>	103,9	20,3	73,1	180,0
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>	37,9	7,6	30,3	87,0
<b>Obwód w talii [cm]</b>	108,9	15,5	80,0	164,0

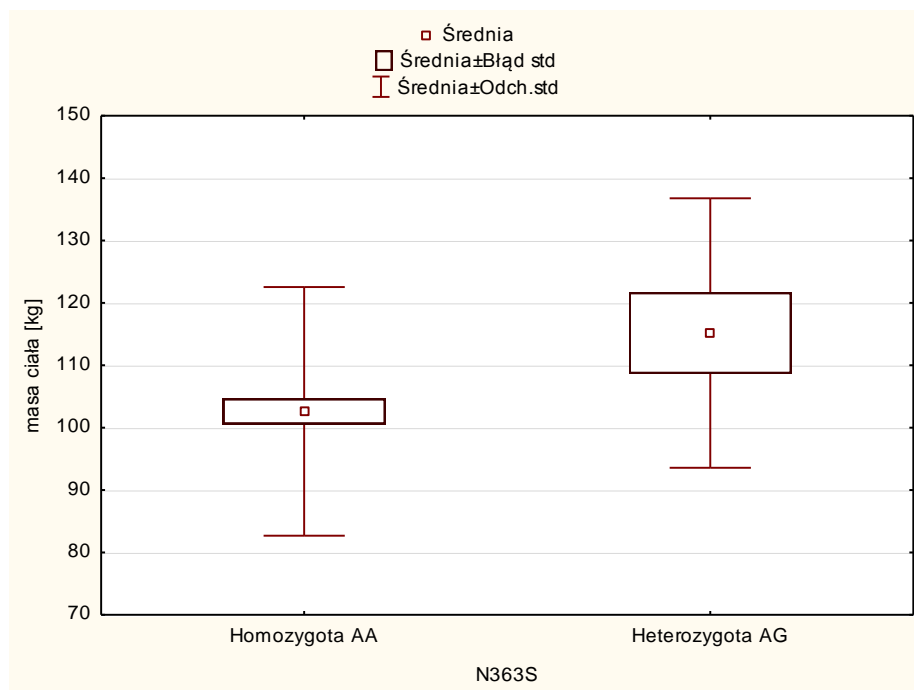
Analiza korelacji masy ciała z określonym polimorfizmem genu GR w grupie badanej została przeprowadzona przy użyciu testu Manna-Whitneya i wykazała, iż pacjentki z wariantem AG polimorfizmu N363S genu receptora glikokortykosteroidów mają wyższą masę ciała w porównaniu do kobiet z wariantem AA. Podobnie analiza wysokości wskaźnika BMI w grupie badanej przeprowadzona przy pomocy testu Manna-Whitneya ujawniła, że chore z wariantem AG polimorfizmu N363S genu GR posiadają wyższy wskaźnik masy ciała (BMI) niż chore z wariantem AA.

Najmniejszy obwód w talii wynosił 80cm, natomiast największy 164cm. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy obwodem w talii w cm a występowaniem polimorfizmów genu GR. Dane te zostały przedstawione w tabeli 7 oraz na rycinach 9 i 10.

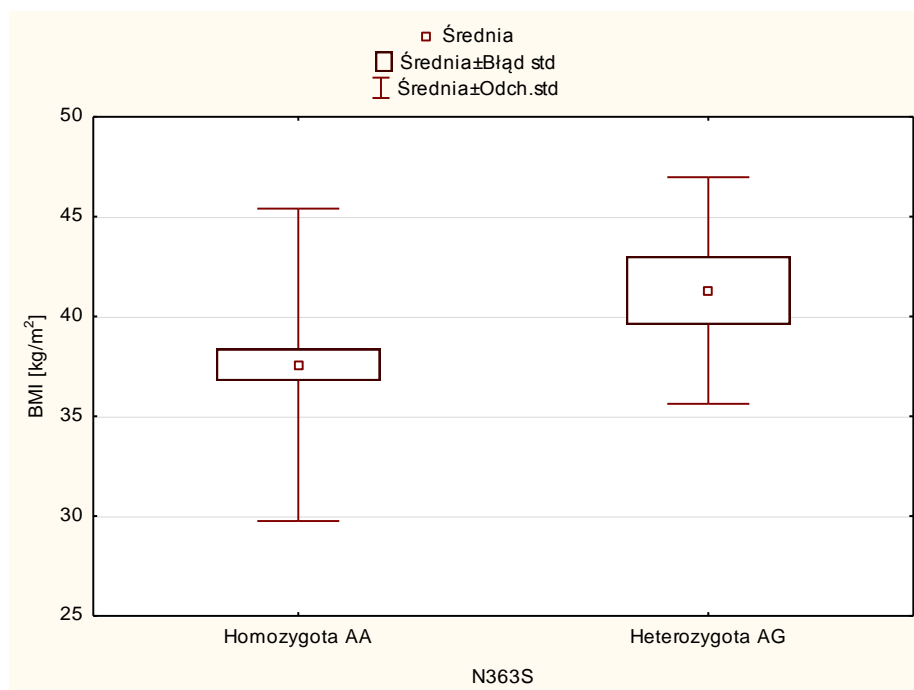
**Tab. 7 Związek rodzaju polimorfizmu N363S z masą ciała, BMI oraz obwodem w talii w badanej grupie. AA- homozygota AA polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów, BMI- wskaźnik masy ciała.**

N=106	Polimorfizm N363S		p
	AA n=95	AG n=11	
<b>Masa ciała <math>\pm</math> SD [kg]</b>	102,6 $\pm$ 19,9	115,2 $\pm$ 21,6	p<0,05
<b>BMI <math>\pm</math>SD [kg/m<sup>2</sup>]</b>	37,6 $\pm$ 7,8	41,3 $\pm$ 5,6	p<0,05
<b>Obwód w talii [cm]</b>	112,7 $\pm$ 16,8	108,4 $\pm$ 15,4	p>0,05





**Ryc. 9. Średnie wartości masy ciała u pacjentek z polimorfizmem N363S ( $p < 0,05$ )**



**Ryc. 10 Średnia wartość BMI u pacjentów z polimorfizmem N363S. BMI-wskaźnik masy ciała ( $p < 0,05$ )**

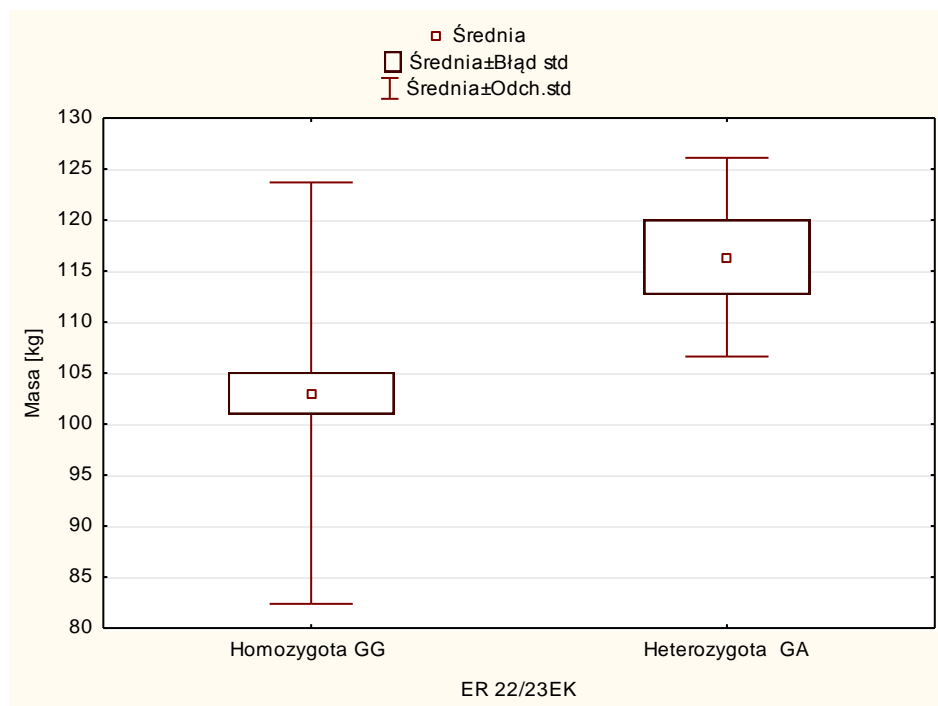
**Tab. 8 Związek rodzaju polimorfizmu Bcll z masą ciała, BMI oraz obwodem w talii w badanej grupie. CC- homozygota CC polimorfizmu Bcll receptora glikokortykosteroidów, CG- heterozygota CG polimorfizmu Bcll receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu Bcll receptora glikokortykosteroidów, BMI- wskaźnik masy ciała**

N=106	Polimorfizm Bcll			p
	CC n=27	CG n=64	GG n=15	
<b>Masa ciała ± SD [kg]</b>	107,3±23,6	103,9±19,2	97,5±18,1	p>0,05
<b>BMI ±SD [kg/m<sup>2</sup>]</b>	40,5± 10,9	37,2± 5,9	36,1± 6,4	p>0,05
<b>Obwód w talii [cm]</b>	109,9 ± 18,6	108,6 ± 13,8	108,1±17,2	p>0,05

Również w odniesieniu do polimorfizmu ER22/23EK u chorych z allelem GA stwierdzono istotną statystycznie wyższą masę ciała w porównaniu z pacjentkami z allelem GG. Natomiast nie wykazano tej istotności dla pozostałych badanych polimorfizmów (szczegółowe dane przedstawione w tabelach 9 do 10 oraz na rycinie 11).

**Tab. 9 Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK z masą ciała, BMI oraz obwodem w talii w badanej grupie. GG- homozygota GG polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów, GA- heterozygota GA polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów, BMI- wskaźnik masy ciała**

N=106	Polimorfizm ER22/23EK		p
	GG n=99	AG n=7	
<b>Masa ciała ± SD [kg]</b>	103,03±20,65	116,3±9,7	p<0,05
<b>BMI ±SD [kg/m<sup>2</sup>]</b>	37,8± 7,8	39,9± 4,5	p>0,05
<b>Obwód w talii [cm]</b>	108,4 ±15,5	115,1 ±15,8	p>0,05



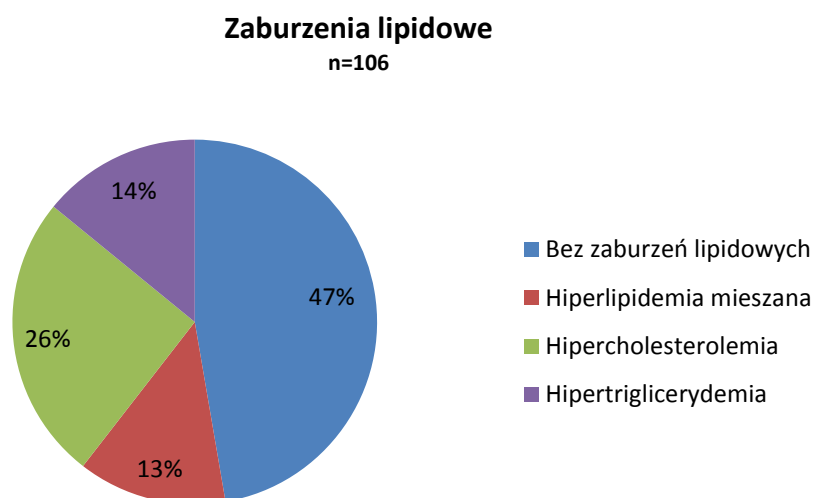
**Ryc 11. Średnie wartości masy ciała u pacjentek z polimorfizmem ER22/23EK ( $p < 0,05$ ).**

**Tab. 10 Związek rodzaju polimorfizmu A3669G z masą ciała, BMI oraz obwodem w talii w badanej grupie. AA- homozygota AA polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, BMI- wskaźnik masy ciała.**

N=106	Polimorfizm A3669G			p
	AA n=71	AG n=26	GG n=9	
<b>Masa ciała ± SD [kg]</b>	103,6±21,8	103,9± 15,9	106,1±21,9	p>0,05
<b>BMI ± SD [kg/m<sup>2</sup>]</b>	38,03± 8,3	37,12± 5,7	39,8± 7,3	p>0,05
<b>Obwód w talii [cm]</b>	108,0±15,8	107,8±13,6	115,4±18,7	p>0,05

### 4.3 Gospodarka lipidowa

W badanej grupie u 14 pacjentek wykazano zaburzenia gospodarki lipidowej o charakterze hiperlipidemii mieszanej, u 27 stwierdzono hipertrójglicydemię, natomiast hipercholesterolemia występowała u 15 kobiet. 50 badanych charakteryzowało się prawidłowym profilem lipidowym.



**Ryc. 12 Zaburzenia lipidowe w grupie badanej.**

Wartości średnie, minimalne i maksymalne stężenia cholesterolu całkowitego, LDL, HDL i trójglicerydów w badanej grupie pokazano w tabeli 11.

**Tab. 11 Wartości średnie  $\pm$ SD, minimalne i maksymalne stężenia cholesterolu całkowitego, LDL, trójglicerydów oraz HDL w badanej grupie. LDL- frakcja LDL cholesterolu, HDL-frakcja HDL cholesterolu**

N=106	Średnie	Odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum
<b>Cholesterol całkowity [mg/dl]</b>	193,0	35,1	112,0	325,0
<b>Cholesterol LDL [mg/dl]</b>	115,5	46,2	19,0	465,0
<b>Trójglicerydy [mg/dl]</b>	122,9	62,4	39,0	401,0
<b>Cholesterol HDL [mg/dl]</b>	47,82	15,3	16,0	83,0

Nie stwierdzono wpływu obecności badanych polimorfizmów genu receptora glikokortykosteroidów na stężenie cholesterolu całkowitego, trójglicerydów oraz cholesterolu HDL. W analizowanej grupie stosunek TG/HDL poniżej 2,5 występował u 58 pacjentek natomiast powyżej 2,5 wśród 48 badanych. Nie zaobserwowano istotności statystycznej w zakresie wpływu obecności wariantów badanego genu na opisywaną relację. Tabele 12 do 15 przedstawiają analizę zależności pomiędzy poszczególnymi polimorfizmami genu GR a parametrami gospodarki lipidowej w badanej grupie chorych.

**Tab. 12 Związek rodzaju polimorfizmu N363S ze stężeniem cholesterolu całkowitego, LDL , trójglicerydów oraz HDL w badanej grupie. AA- homozygota AA polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm N363S		p
	AA n=95	AG n=11	
<b>Cholesterol całkowity ± SD [mg/dl]</b>	191,9± 35,7	202,6± 28,6	p>0,05
<b>Cholesterol LDL ± SD [mg/dl]</b>	111,8± 32,2	147,1± 107,2	p>0,05
<b>Trójglicerydy ± SD [mg/dl]</b>	119,2± 56,9	154,9± 95,7	p>0,05
<b>Cholesterol HDL ± SD [mg/dl]</b>	47,90± 14,99	47,13±18,67	p>0,05

**Tab. 13 Związek rodzaju polimorfizmu Bcll ze stężeniem cholesterolu całkowitego, LDL, trójglicerydów oraz HDL w badanej grupie. CC- homozygota CC polimorfizmu Bcll receptora glikokortykosteroidów, CG- heterozygota CG polimorfizmu Bcll receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu Bcll receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm Bcll			p
	CC n=27	CG n=64	GG n=15	
Cholesterol całkowity ± SD [mg/dl]	182,2± 34,6	197,6± 36,1	192,7± 29,1	p>0,05
Cholesterol LDL ± SD [mg/dl]	101,8± 29,7	121,9± 54,1	112,6± 25,5	p>0,05
Trójglicerydy ± SD [mg/dl]	107,1± 43,3	131,1± 70,7	116,3± 48,8	p>0,05
Cholesterol HDL ± SD [mg/dl]	46,9± 16,0	47,8± 5,5	49,3± 3,8	p>0,05

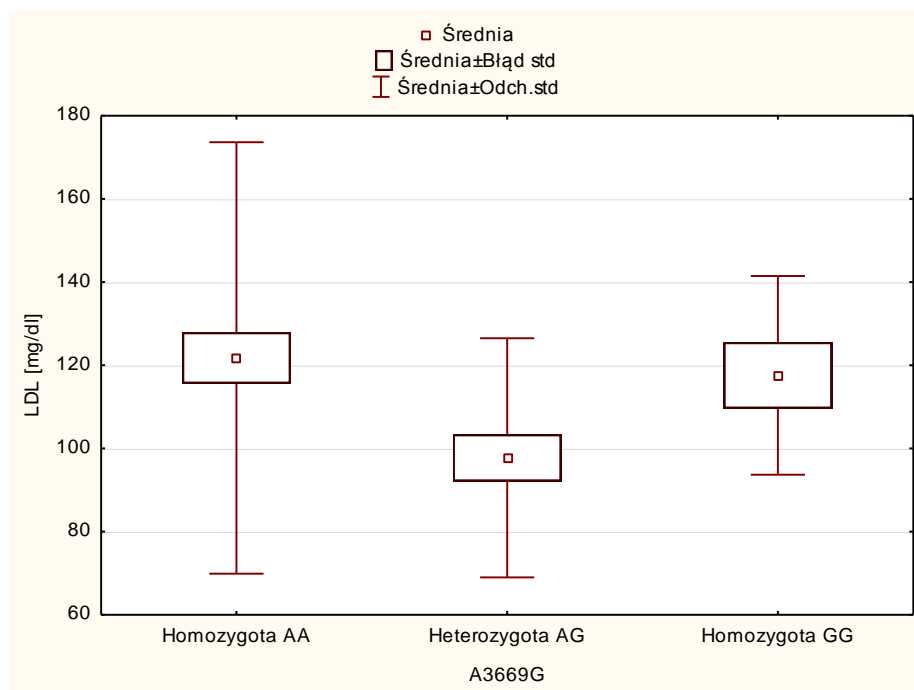
**Tab. 14 Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK ze stężeniem cholesterolu całkowitego, LDL, trójglicerydów oraz HDL w badanej grupie. GG- homozygota GG polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów, GA- heterozygota GA polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm ER22/23EK		p
	GG n=99	GA n=7	
Cholesterol całkowity ± SD [mg/dl]	193,9± 34,7	180± 41,5	p>0,05
Cholesterol LDL ± SD [mg/dl]	116,6± 46,9	99,5± 33,6	p>0,05
Trójglicerydy ± SD [mg/dl]	123,1± 62,9	120,8± 58,8	p>0,05
Cholesterol HDL ± SD [mg/dl]	48,1 ± 15,5	44,1± 12,1	p>0,05

Analiza stężenia LDL w grupie badanej przeprowadzona przy pomocy testu Manna-Whitneya ujawniła, że chore z wariantem AG polimorfizmu A3669G genu GR posiadają istotnie statystycznie niższe stężenie cholesterolu frakcji LDL niż chore z wariantem AA i GG – rycina 2, natomiast nie wykazano tej istotności dla pozostałych badanych polimorfizmów.

**Tab. 15 Związek rodzaju polimorfizmu A3669G ze stężeniem cholesterolu całkowitego, LDL, trójglicerydów oraz HDL w badanej grupie. AA- homozygota AA polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm A3669G			p
	AA n=71	AG n=26	GG n=9	
<b>Cholesterol całkowity ± SD [mg/dl]</b>	196,5± 37,2	182,6± 30,2	195,3± 28,2	p>0,05
<b>Cholesterol LDL ± SD [mg/dl]</b>	121,7± 51,8	97,7± 28,7	117,5± 23,8	p<0,05
<b>Trójglicerydy ± SD [mg/dl]</b>	126,9± 66,9	114,0± 50,4	117,1± 60	p>0,05
<b>Cholesterol HDL ± SD [mg/dl]</b>	47,17±15,39	48,87±16,18	50,0 ±13,19	p>0,05



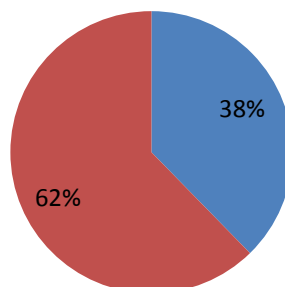
**Ryc . 13 Średnie stężenie frakcji LDL cholesterolu u pacjentek z polimorfizmem A3669G(  $p < 0,05$ ).**

Pacjentki z wariantem AG polimorfizmu GR N363S charakteryzowały się istotnie statystycznie większą częstością występowania jakichkolwiek zaburzeń gospodarki lipidowej (hipercholesterolemii, hiperlipidemii mieszanej, hipertrójglicydemii) w porównaniu do pacjentek z wariantem AA ( $p = 0,0457$ ).



**Zaburzenia lipidowe**  
hiperlipidemia mieszana, hipercholesterolemia,  
hipertrójglicydemia

■ Wariant AA N363S ■ Wariant AG N363S



***Ryc. 14 Zaburzenia lipidowe u pacjentek z polimorfizmami AA i AG N363S w badanej grupie. Wartość  $p= 0,0457$  z testu Fisher-Freeman-Halton'a.***

Analizując również częstość występowania zaburzeń metabolicznych u pacjentek z grupy badanej z polimorfizmem ER22/23EK stwierdzono, iż kobiety z wariantem GG tego polimorfizmu charakteryzowały się częstszym występowaniem hipercholesterolemii, hiperlipidemii mieszanej, czy też hipertriglicydemii (98%) w porównaniu do badanych z wariantem GA.

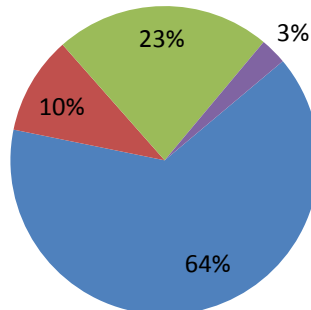
#### **4.4 Zaburzenia gospodarki węglowodanowej.**

##### **4.4.1 Glikemia na czczo oraz w 120 minucie OGTT.**

U każdej z pacjentek przeprowadzono test doustnego obciążenia 75g glukozy (OGTT). Nie wykazano wpływu obecności badanych polimorfizmów genu receptora glikokortykosteroidów na stężenie glukozy na czczo i w 120 minucie. Wykonanie testu OGTT pozwoliło rozpoznać cukrzycę typu 2 u 3 osób, u kolejnych 24 osób zdiagnozowano nieprawidłową tolerancję glukozy, natomiast liczba pacjentek z nieprawidłową glikemią na czczo wyniosła 11.

**Zaburzenia gospodarki węglowodanowej**  
n=106

■ NGT ■ IFG ■ IGT ■ DM



**Ryc. 15 Zaburzenia gospodarki węglowodanowej w badanej grupie. NGT- prawidłowa tolerancja glukozy, IFG- nieprawidłowa glikemia na czczo, IGT- nieprawidłowa tolerancja glukozy, DM- cukrzyca typu 2.**

Wartości średnie, minimalne i maksymalne stężenia glukozy na czczo, w 120 minucie w badanej grupie podano w tabeli 16.

**Tab. 16 Wartości średnie  $\pm$ SD, minimalne i maksymalne stężenia glukozy na czczo, w 120 minucie w badanej grupie.**

N=106	Średnia	Odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum
<b>Glukoza na czczo [mg/dl]</b>	91,8	11,5	71,0	139,0
<b>Glukoza w 120 min. OGTT [mg/dl]</b>	121,2	34,3	57,0	287,0

Tabele od 17 do 20 przedstawiają analizę zależności analizowanych parametrów gospodarki węglowodanowej do poszczególnych badanych polimorfizmów genu GR.

**Tab. 17 Związek rodzaju polimorfizmu N363S ze stężeniem glukozy na czczo oraz w 120 minucie OGTT w badanej grupie. AA- homozygota AA polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm N363S		p
	AA n=95	AG n=93	
<b>Glukoza na czczo ± SD [mg/dl]</b>	92,2± 11,8	87,9± 6,9	p>0,05
<b>Glukoza w 120 min. OGTT ± SD [mg/dl]</b>	121,1± 35,2	121,2± 26,4	p>0,05

**Tab. 18 Związek rodzaju polimorfizmu Bcl1 ze stężeniem glukozy na czczo oraz w 120 minucie OGTT w badanej grupie. CC- homozygota CC polimorfizmu Bcl1 receptora glikokortykosteroidów, CG- heterozygota CG polimorfizmu Bcl1 receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu Bcl1 receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm Bcl1			p
	CC n=27	CG n=64	GG n=15	
<b>Glukoza na czczo ± SD [mg/dl]</b>	89,3± 9,7	92,2± 11,6	94,1± 13,7	p>0,05
<b>Glukoza w 120 min. OGTT ± SD [mg/dl]</b>	125,8± 27,2	119,5± 36,7	119,8± 36,4	p>0,05

**Tab. 19 Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK ze stężeniem glukozy na czczo oraz w 120 minucie OGTT w badanej grupie. GG- homozygota GG polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów, GA- heterozygota GA polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm ER22/23EK		p
	GG n=99	GA n=7	
<b>Glukoza na czczo ± SD [mg/dl]</b>	91,5± 11,6	94,8± 9,2	p>0,05
<b>Glukoza w 120 min. OGTT ± SD [mg/dl]</b>	120,7± 34,7	127,5± 28,8	p>0,05

**Tab. 20 Związek rodzaju polimorfizmu A3669G ze stężeniem glukozy na czczo oraz w 120 minucie OGTT w badanej grupie. AA- homozygota AA polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm A3669G			p
	AA n=71	AG n=26	GG n=9	
<b>Glukoza na czczo ± SD [mg/dl]</b>	90,5± 11,4	93,1± 8,8	97,2± 17,1	p>0,05
<b>Glukoza w 120 min.± SD [mg/dl]</b>	120,5± 34,7	120,4± 30,6	128,3± 43,3	p>0,05

#### 4.4.2 Insulina na czczo, w 2 godzinie OGTT, HOMA-IR oraz rezerwa insulinowa

Wartości średnie, minimalne i maksymalne stężenia insuliny na czczo, w 120 minucie, HOMA-IR, rezerwy insulinowej w grupie badanej pokazano w tabeli 21. Ocenę czynności komórek beta wysp trzustkowych dokonano oznaczając stężenie insuliny na czczo oraz w 120 minucie po spożyciu 75g glukozy. Nie wykazano wpływu obecności badanych polimorfizmów genu receptora glikokortykosteroidów na stężenie insuliny na czczo ani w 2 godzinie po OGTT. Rezerwę insulinową wysp beta trzustki oceniano analizując różnicę w stężeniu insuliny w teście obciążenia glukozą przed i po 120 minutach od podania glukozy. Nie wykazano wpływu obecności badanych polimorfizmów genu receptora glikokortykosteroidów na wartości rezerwy insulinowej (tab. 22 do 25).

**Tab. 21** Wartości średnie  $\pm$ SD, minimalne i maksymalne stężenia insuliny na czczo, w 120 minucie, HOMA-IR, rezerwy insulinowej w grupie badanej

N=106	Średnie	Odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum
Insulina na czczo [ $\mu$ U/ml]	14,9	11,5	3,1	82,0
Insulina w 120 min. OGTT [ $\mu$ U/ml]	75,7	61,0	5,9	349,5
HOMA IR [ $mg/dl \times \mu$ U/ml]	3,5	3,4	0,64	26,7
Rezerwa insulinowa [ $\mu$ U/ml]	62,3	56,2	0,0	323,1

**Tab. 22 Związek rodzaju polimorfizmu N363S ze stężeniem insuliny na czczo, w 120 minucie po OGTT, HOMA IR, rezerwą insulinową w badanej grupie. AA- homozygota AA polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm N363S		p
	AA n=95	AG n=11	
Insulina na czczo $\pm$ SD [ $\mu$ U/ml]	14,9 $\pm$ 11,9	15,6 $\pm$ 7,1	p>0,05
Insulina w 120 min. OGTT $\pm$ SD [ $\mu$ U/ml]	75,2 $\pm$ 61,3	79,7 $\pm$ 60,6	p>0,05
HOMA IR $\pm$ SD [mg/dl x $\mu$ U/ml]	3,5 $\pm$ 3,6	3,4 $\pm$ 1,7	p>0,05
Rezerwa insulinowa $\pm$ SD [ $\mu$ U/ml]	62,2 $\pm$ 56,6	64,1 $\pm$ 55,1	p>0,05

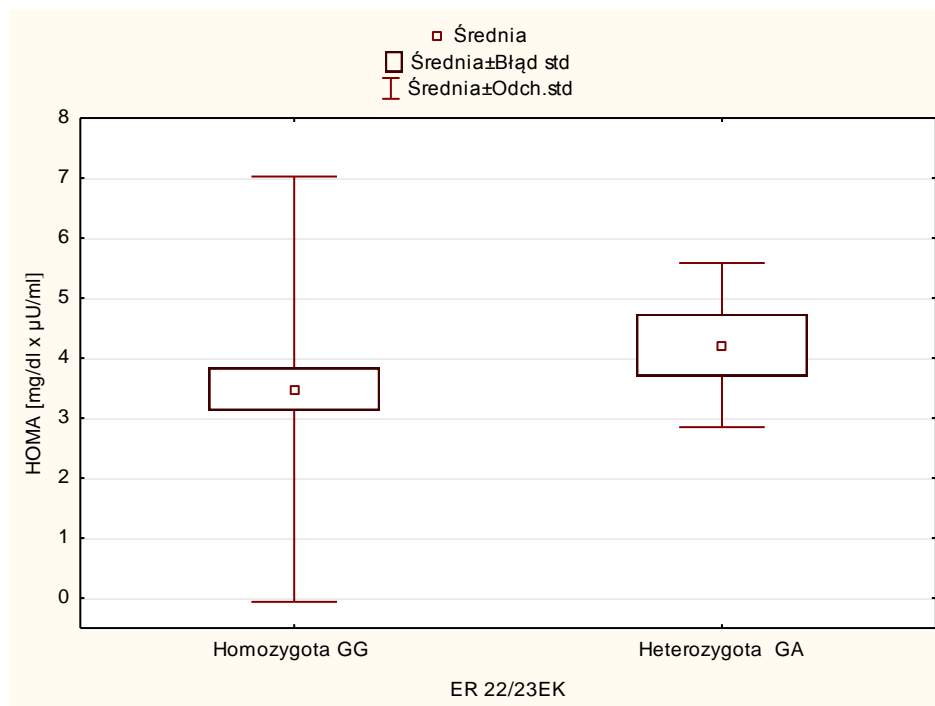
**Tab. 23 Związek rodzaju polimorfizmu BclI ze stężeniem insuliny na czczo, w 120 minucie po OGTT, HOMA IR, rezerwą insulinową w badanej grupie. CC- homozygota CC polimorfizmu BclI receptora glikokortykosteroidów, CG- heterozygota CG polimorfizmu BclI receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu BclI receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm BclI			p
	CC n=27	CG n=64	GG n=15	
Insulina na czczo $\pm$ SD [ $\mu$ U/ml]	14,2 $\pm$ 6,9	14,5 $\pm$ 11	18,1 $\pm$ 18,4	p>0,05
Insulina w 120 min. OGTT $\pm$ SD [ $\mu$ U/ml]	86,5 $\pm$ 76,9	70,6 $\pm$ 52,9	77,9 $\pm$ 63,1	p>0,05
HOMA IR $\pm$ SD [mg/dl x $\mu$ U/ml]	3,2 $\pm$ 1,8	3,4 $\pm$ 3	4,6 $\pm$ 6,3	p>0,05
Rezerwa insulinowa $\pm$ SD [ $\mu$ U/ml]	72,7 $\pm$ 72,7	58,3 $\pm$ 49,5	60,8 $\pm$ 50,8	p>0,05

U pacjentek z allelem GG wskaźnik insulinooporności HOMA IR był istotnie statystycznie mniejszy w porównaniu do kobiet z allelem GA polimorfizmu ER22/23EK. W odniesieniu do pozostałych polimorfizmów nie stwierdzono takiej zależności (tab. 24 i rycina 16).

**Tab. 24 Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK ze stężeniem insuliny na czczo, w 120 minucie po OGTT, HOMA IR, rezerwą insulinową w badanej grupie. GG- homozygota GG polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów, GA- heterozygota GA polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortyko-steroidowego.**

N=106	Polimorfizm ER22/23EK		p
	GG n=99	GA n=7	
Insulina na czczo $\pm$ SD [ $\mu$ U/ml]	14,7 $\pm$ 11,8	17,9 $\pm$ 5,2	p>0,05
Insulina w 120 min. OGTT $\pm$ SD [ $\mu$ U/ml]	74,6 $\pm$ 60,9	90,9 $\pm$ 64,7	p>0,05
HOMA IR $\pm$ SD [mg/dl x $\mu$ U/ml]	3,5 $\pm$ 3,5	4,2 $\pm$ 1,3	p<0,05
Rezerwa insulinowa $\pm$ SD [ $\mu$ U/ml]	61,5 $\pm$ 55,8	74,8 $\pm$ 64,7	p>0,05

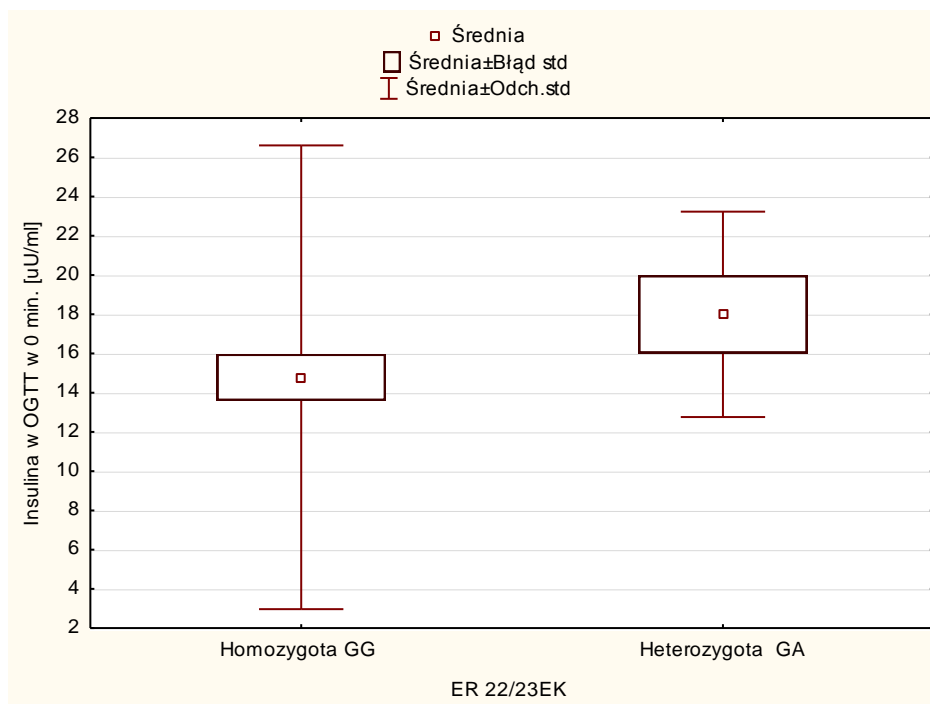


**Ryc . 16 Średnia wartość wskaźnika HOMA IR u pacjentek w grupie ER22/23 EK. HOMA- IR - wskaźnik insulinooporności (  $p=0,043763$ ).**

**Tab. 25 Związek rodzaju polimorfizmu A3669G ze stężeniem insuliny na czczo, w 120 min. po OGTT, HOMA IR, rezerwą insulinową w badanej grupie. AA- homozygota AA polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, GG homozygota GG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm A3669G			p
	AA n=71	AG n=26	GG n=9	
<b>Insulina na czczo <math>\pm</math> SD [<math>\mu</math>U/ml]</b>	75,1 $\pm$ 60,4	74,5 $\pm$ 57,8	83,2 $\pm$ 79,5	$p>0,05$
<b>Insulina 120 min. OGTT <math>\pm</math> SD [<math>\mu</math>U/ml]</b>	75,1 $\pm$ 60,4	74,5 $\pm$ 57,8	83,2 $\pm$ 79,6	$p>0,05$
<b>HOMA IR <math>\pm</math> SD [mg/dl x <math>\mu</math>U/ml]</b>	3,3 $\pm$ 2,9	3,2 $\pm$ 1,7	6,4 $\pm$ 7,7	$p>0,05$
<b>Rezerwa insulinowa <math>\pm</math> SD [<math>\mu</math>U/ml]</b>	63 $\pm$ 56,2	62 $\pm$ 55,7	58 $\pm$ 64,1	$p>0,05$





**Ryc. 17 Stężenie insuliny na czczo u pacjentek z polimorfizmem ER22/23 EK.**

#### **4.5 Oś przysadkowo-nadnerczowa- kortyzol poranny godzina 8.00, wieczorny 16.00-18.00 oraz ACTH.**

Wartości średnie, minimalne oraz maksymalne stężenia kortyzolu o godzinie 8.00 , kortyzolu wieczornego mierzonego w godzinach 16.00-18.00 oraz ACTH u osób badanych przedstawiono w tab. 26. Rozkład tych wartości w obu grupach miał charakter rozkładu normalnego. Nie wykazano istotnego wpływu obecności badanych polimorfizmów genu receptora glikokortykosteroidów na stężenie kortyzolu mierzonego w surowicy krwi żyłnej pobranej o godzinie 8 rano, jak również na stężenie kortyzolu w godzinach wieczornych. Dane te przedstawiono w tabelach 27-30. U części pacjentek przeprowadzono krótki hamowania małą dawką deksametazonu. Chorym podawano 1mg deksametazonu o godz. 23.00 oraz oznaczano stężenie kortyzolu w surowicy na czczo dnia następnego o godz. 8.00. Dobową zbiórkę moczu na kortyzol wykonano u 85 pacjentek, średnia wartość dobowego wydalania kortyzolu wynosiła:  $142,88 \pm 81,09$  nmol/24h, minimalna 20 nmol/24h, a maksymalna 527 nmol/24h. Ze względu na proces rekrutacji pacjentek (chore pochodziły z wielu ośrodków) oraz niewielką liczbę wyników danych tych nie poddano analizie statystycznej.

Nie stwierdzono istotnego statystycznie wpływu polimorfizmów GR na stężenie ACTH.

**Tab. 26 Wartości średnie  $\pm$ SD, minimalne i maksymalne wartości stężenia kortyzolu porannego o godzinie 8.00 , kortyzolu wieczornego (16.00-18.00) oraz ACTH w badanej grupie.**

<b>N=106</b>	Średnie	Odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum
<b>Kortyzol poranny godzina 8.00 [nmol/l]</b>	481,1	214,7	118	1184
<b>Kortyzol godzina 16.00- 18.00 [nmol/l]</b>	481,1	140,7	3,19	675
<b>ACTH [pg/ml]</b>	30,1	33,26	2,1	264,4

**Tab. 27 Związek rodzaju polimorfizmu N363S ze stężeniem kortyzolu porannego o godzinie 8.00, kortyzolu wieczornego (16.00-18.00) oraz ACTH. AA- homozygota AA polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów.**

<b>N=106</b>	<b>Polimorfizm N363S</b>		<b>p</b>
	<b>AA n=95</b>	<b>AG n=11</b>	
<b>Kortyzol poranny godzina 8.00 <math>\pm</math> SD [nmol/l]</b>	477,4 $\pm$ 214,4	512,6 $\pm$ 225,2	p>0,05
<b>Kortyzol godzina 16.00-18.00 <math>\pm</math> SD [nmol/l]</b>	233,5 $\pm$ 126,4	306,4 $\pm$ 224,2	p>0,05
<b>ACTH <math>\pm</math> SD [pg/ml]</b>	30,8 $\pm$ 35,1	24,5 $\pm$ 7,8	p>0,05

**Tab. 28 Związek rodzaju polimorfizmu BclII ze stężeniem kortyzolu porannego o godzinie 8.00 , kortyzolu wieczornego (16.00-18.00) oraz ACTH w badanej grupie. CC- homozygota CC polimorfizmu BclII receptora glikokortykosteroidów, CG- heterozygota CG polimorfizmu BclII receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu BclII receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm BclII			p
	CC n=27	CG n=64	GG n=15	
Kortyzol poranny godzina 8.00 ± SD [nmol/l]	486,6±236,4	456,3±205,1	575,4±200	p>0,05
Kortyzol godzina 16.00- 18.00± SD [nmol/l]	225,5±135,9	249±150,7	245,1±119,4	p>0,05
ACTH ± SD [pg/ml]	29,6±29,6	29,9±37,3	31,3±26,2	p>0,05

**Tab. 29 Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK ze stężeniem kortyzolu porannego o godzinie 8.00 , kortyzolu wieczornego (16.00-18.00) oraz ACTH w badanej grupie. GG- homozygota GG polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów, GA- heterozygota GA polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm ER22/23EK		p
	GG n=99	GA n=7	
Kortyzol poranny godzina 8.00 ± SD [nmol/l]	488,3±217,5	379,8±146,3	p>0,05
Kortyzol godzina 16.00- 18.00± SD [nmol/l]	244±142,7	212,1±118,9	p>0,05
ACTH ± SD [pg/ml]	31,1±34,4	17,6±7,7	p>0,05

**Tab. 30 Związek rodzaju polimorfizmu A3669G ze stężeniem kortyzolu porannego o godzinie 8.00 , kortyzolu wieczornego (16.00-18.00) oraz ACTH w badanej grupie. AA- homozygota AA polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów.**

N=106	Polimorfizm A3669G			p
	AA n=71	AG n=26	GG n=9	
<b>Kortyzol poranny godzina 8.00 ± SD [nmol/l]</b>	501,1±230,6	454,2±154,5	403,3±230,6	p>0,05
<b>Kortyzol godzina 16.00- 18.00± SD [nmol/l]</b>	246±142,8	234,8±149,8	228,3±107,2	p>0,05
<b>ACTH ± SD [pg/ml]</b>	32,7±39,2	26,2±18,4	21,7±8,6	p>0,05

#### 4.6 Białko C-reaktywne

Średnie stężenie białka C-reaktywnego ocenianego metodą wyskokoczułą wynosiło w badanej grupie 6,336± 3,575 mg/l. Rozkład tych wartości w obu grupach miał charakter rozkładu normalnego. Nie wykazano wpływu obecności badanych polimorfizmów genu receptora glikokortykosteroidów na stężenie białka C-reaktywnego (szczegółowe dane zawarto w tabelach: 32-35).

**Tab. 31 Wartości średnie ±SD, minimalne i maksymalne stężenia hsCRP w badanej grupie. hsCRP- białko C-reaktywne oceniane metodą wyskokoczułą.**

N=106	Średnie	Odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum
<b>hsCRP [mg/l]</b>	6,33	3,57	0,40	11,00

**Tab. 32 Związek rodzaju polimorfizmu N363S ze stężeniem hsCRP. AA- homozygota AA polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów, hsCRP- białko C-reaktywne oceniane metodą wysokoczułą.**

N=106	Polimorfizm N363S		p
	AA n=95	AG n=11	
hsCRP ± SD [mg/l]	6,3±3,5	6,3±3,9	p>0,05

**Tab. 33 Związek rodzaju polimorfizmu Bcll ze stężeniem hsCRP w badanej grupie. CC- homozygota CC polimorfizmu Bcll receptora glikokortykosteroidów, CG- heterozygota CG polimorfizmu Bcll receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu Bcll receptora glikokortykosteroidów, hsCRP- białko C-reaktywne oceniane metodą wysokoczułą.**

N=106	Polimorfizm Bcll			p
	CC n=27	CG n=64	GG n=15	
hsCRP ± SD [mg/l]	6,3±4,1	6,2±3,2	6,7±3,8	p>0,05

**Tab. 34 Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK ze stężeniem hsCRP w badanej grupie. GG- homozygota GG polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów, GA- heterozygota GA polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów hsCRP- białko C-reaktywne oceniane metodą wysokoczułą.**

N=106	Polimorfizm ER22/23EK		p
	GG n=99	GA n=7	
hsCRP ± SD [mg/l]	6,3±3,5	6,2±3,9	p>0,05

**Tab. 35 Związek rodzaju polimorfizmu A3669G ze stężeniem hsCRP w badanej grupie. AA- homozygota AA polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, hsCRP- białko C-reaktywne oceniane metodą wysokoczułą.**

N=106	Polimorfizm A3669G			p
	AA n=71	AG n=26	GG n=9	
hsCRP ± SD [mg/l]	6,5± 3,4	5,6±3,7	6,9±3,9	p>0,05

#### **4.7 Skład masy ciała- tkanka tłuszczowa, zawartość wody pozakomórkowej w organizmie**

Wartości średnie ±SD, minimalne i maksymalne wartości zawartości tłuszczu w organizmie, ECW oraz FFM w badanej grupie przedstawia tabela 36. Rozkład tych wartości w obu grupach miał charakter rozkładu normalnego.

Analiza średniej procentowej zawartości tłuszczu w grupie badanej przeprowadzona przy pomocy t-testu ujawniła, że chore z wariantem AA polimorfizmu N363S genu GR charakteryzują się mniejszą zawartością tłuszczu w organizmie w porównaniu do pacjentek z wariantem AG, natomiast nie wykazano tej istotności dla pozostałych badanych polimorfizmów. Nie stwierdzono wpływu obecności badanych polimorfizmów genu receptora na procentową zawartość wody pozakomórkowej w organizmie w grupie badanej. Szczegółowe dane przedstawiono w tabelach: 37-40.

**Tab. 36 Wartości średnie  $\pm$ SD, minimalne i maksymalne wartości zawartości tłuszczu w organizmie, ECW oraz FFM w badanej grupie. ECW- Extra- cellular body water - woda pozakomórkowa, FFM- Fat - Free Mass, masa beztłuszczowa**

N=106	Średnie	Odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum
% tłuszczu	44,82	4,81	36,30	56,90
ECW [%]	44,82	6,82	33,9	71,6
FFM [kg]	55,5	5,09	40,2	65,50

**Tab. 37 Związek rodzaju polimorfizmu N363S z zawartością tłuszczu w organizmie, ECW oraz FFM w badanej grupie. AA- homozygota AA polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu N363S receptora glikokortykosteroidów, ECW- Extra- cellular body water - woda pozakomórkowa, FFM- Fat Free Mass, masa beztłuszczowa**

N=106	Polimorfizm N363S		p
	AA n=95	AG n=11	
% tłuszczu $\pm$ SD	44,4 $\pm$ 4,8	47,5 $\pm$ 4,05	p<0,05
ECW [%] $\pm$ SD	51,95 $\pm$ 7,1	50 $\pm$ 4,1	p>0,05
FFM [kg]	54,78 $\pm$ 7,09	53,26364 $\pm$ 4,26	p>0,05

**Tab. 38 Związek rodzaju polimorfizmu Bcll z zawartością tłuszczu w organizmie, ECW oraz FFM w badanej grupie. CC- homozygota CC polimorfizmu Bcll receptora glikokortykosteroidów, CG- heterozygota CG polimorfizmu Bcll receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu Bcll receptora glikokortykosteroidów, ECW- Extra- cellular body water - woda pozakomórkowa, FFM- Fat - Free Mass, masa beztłuszczowa**

N=106	Polimorfizm Bcll			p
	CC n=27	CG n=64	GG n=15	
<b>% tłuszczu ± SD</b>	46,1±5,6	44,8±4,5	42,4±4,4	p>0,05
<b>ECW [%]± SD</b>	51±6,2	52±7,2	50,6±5,7	p>0,05
<b>FFM [kg]</b>	54,77± 5,5	55,8± 4,2	55,40± 7,2	p>0,05

**Tab. 39 Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK z zawartością tłuszczu w organizmie, ECW oraz FFM w badanej grupie. GG- homozygota GG polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów, GA- heterozygota GA polimorfizmu ER22/23EK receptora glikokortykosteroidów, ECW- Extra- cellular body water - woda pozakomórkowa, FFM- Fat - Free Mass, masa beztłuszczowa**

N=106	Polimorfizm ER22/23EK		p
	GG n=99	GA n=7	
<b>% tłuszczu ± SD</b>	44,7±4,8	47,4±4,1	p>0,05
<b>ECW [%]± SD</b>	51,9±7	49,3±2,6	p>0,05
<b>FFM [kg]</b>	55,7 ± 5,1	51,8 ± 3,1	p>0,05

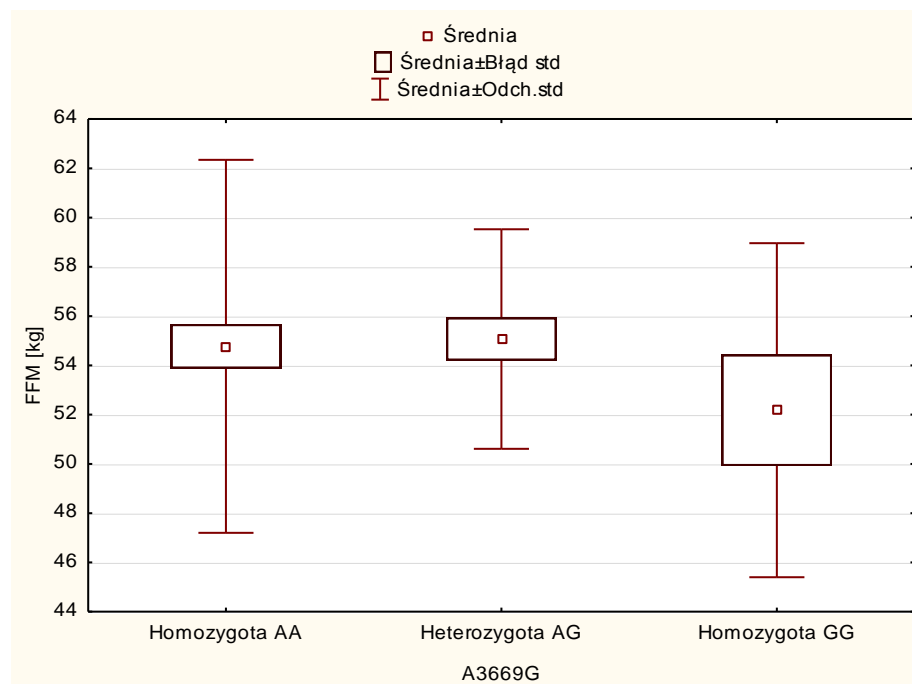
W badaniach wykazano, iż chore z wariantem GG polimorfizmu ER 22/23EK charakteryzują się tendencją do nieco większej zawartości beztłuszczowej masy ciała w porównaniu do pacjentek z allelem GA, jednak w szczegółowej analizie statystycznej wartość p nie osiągnęła istotności statystycznej (p=0,09).



**Tab. 40 Związek rodzaju polimorfizmu A3669G z zawartością tłuszczu w organizmie, ECW oraz FFM w badanej grupie. AA- homozygota AA polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, AG- heterozygota AG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, GG- homozygota GG polimorfizmu A3669G receptora glikokortykosteroidów, ECW- Extra- cellular body water - woda pozakomórkowa, FFM- Fat - Free Mass, masa beztłuszczowa**

N=106	Polimorfizm A3669G			p
	AA n=71	AG n=26	GG n=9	
<b>% tłuszczu ± SD</b>	44,7±5	45,1±4,1	48,5±3,7	p>0,05
<b>ECW [%]± SD</b>	52,1±6,9	51,4±5,7	43,6±13,7	p>0,05
<b>FFM [kg]</b>	55,9±4,9	56,0±4,04	46,7±4,5	<b>p&lt;0,05</b>

U 77 pacjentek analiza składu masy ciała metodą bioimpedancji wykazała średnią wartość beztłuszczowej masy ciała na poziomie 55,5 ± 5,0kg (minimum: 40,2 kg, maksimum 65,5 kg). W analizie statystycznej wykazano, że chore z wariantem AG oraz AA polimorfizmu A3669G genu GR charakteryzowały się istotnie większą beztłuszczową masą ciała w porównaniu do pacjentek z wariantem GG. Nie wykazano tej istotności dla pozostałych badanych polimorfizmów (tabela 40 i ryc. 18).

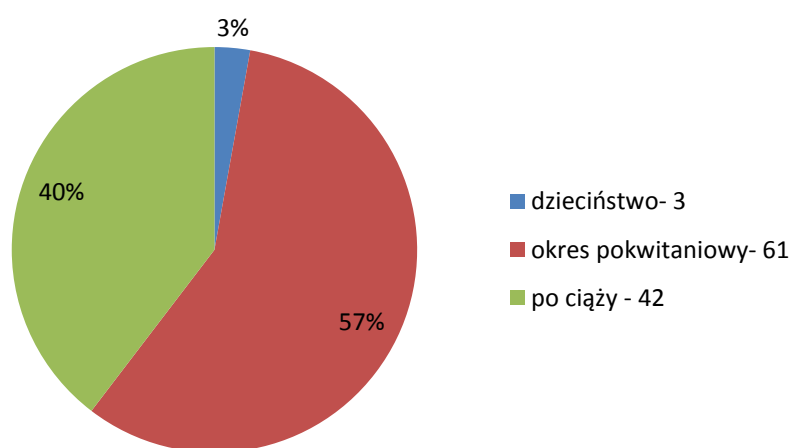


**Ryc. 18 Beztłuszczowa masa ciała (FFM) u pacjentek z polimorfizmem A3669G.  $p < 0,05$  z analizy wariancji ANOVA**

#### 4.8 Moment pojawienia się otyłości

W badanej grupie u 3 (2,83%) pacjentek otyłość pojawiła się w wieku dziecięcym, u kolejnych 61 (57,55%) w okresie pokwitaniowym, natomiast pozostałe 42 (39,62%) pacjentki rozwinęły nadmierną masę ciała po ciąży.

#### Moment pojawienia się otyłości

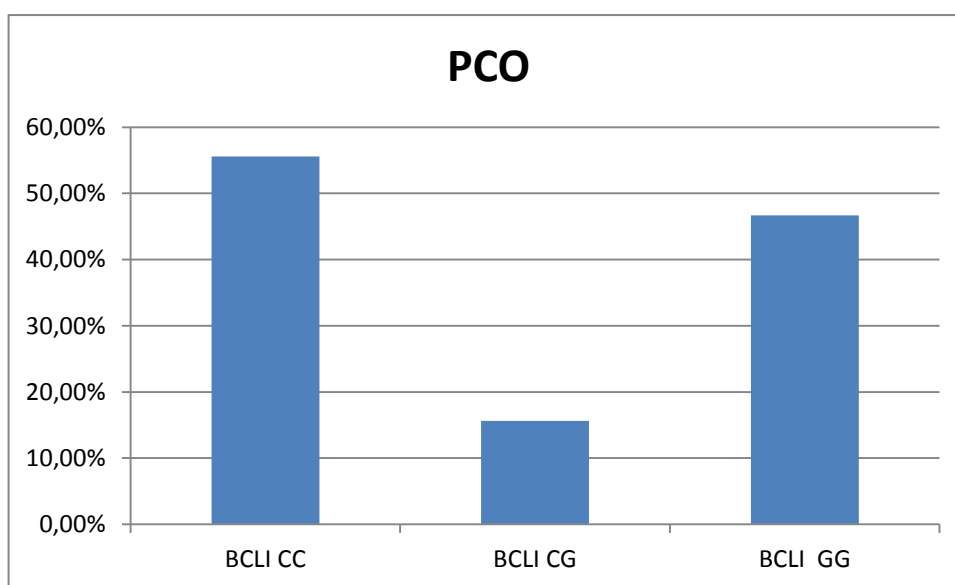


**Ryc. 19 Moment pojawienia się otyłości w badanej grupie.**

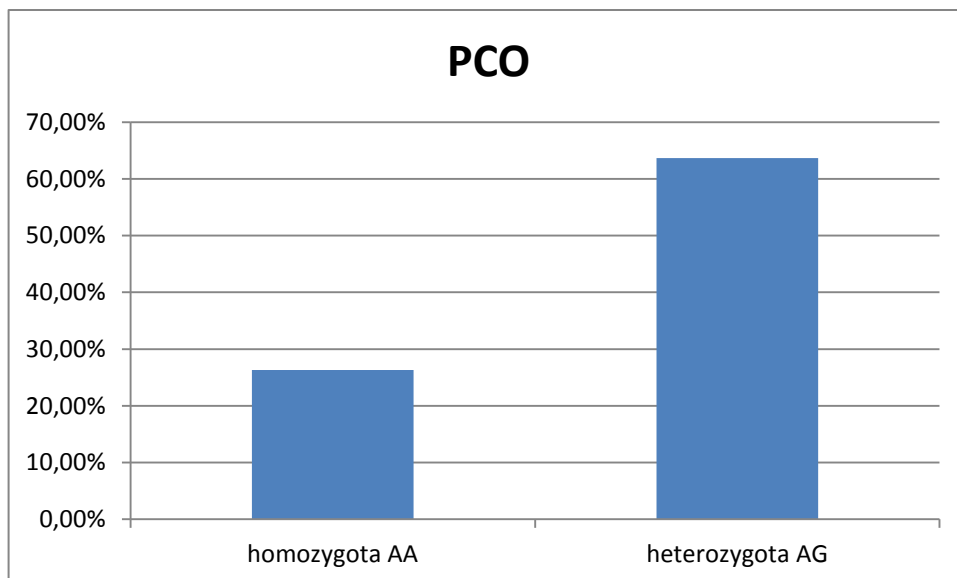
Nie wykazano wpływu polimorfizmów genu *GR* na moment pojawienia się otyłości.

#### 4.9 Zespół policystycznych jajników

W badanej grupie zespół policystycznych jajników rozpoznano u 32 pacjentek. Schorzenie to stwierdzano w badanej grupie istotnie częściej u pacjentek z wariantem CC i GG polimorfizmu BclI genu GR niż u chorych z wariantem CG. Wyliczony iloraz szans (OR) dla kobiet z polimorfizmem CC i GG wynosił 5,94 (przedział ufności PU 2,37-14,86). Wykazano również większą częstość występowania PCO u pacjentek z wariantem AG polimorfizmu N363S w porównaniu do badanych z wariantem AA-rycina (OR 4,9,  $p < 0,05$ ). Nie wykazano tej istotności dla pozostałych badanych (ryciny 20 i 21).



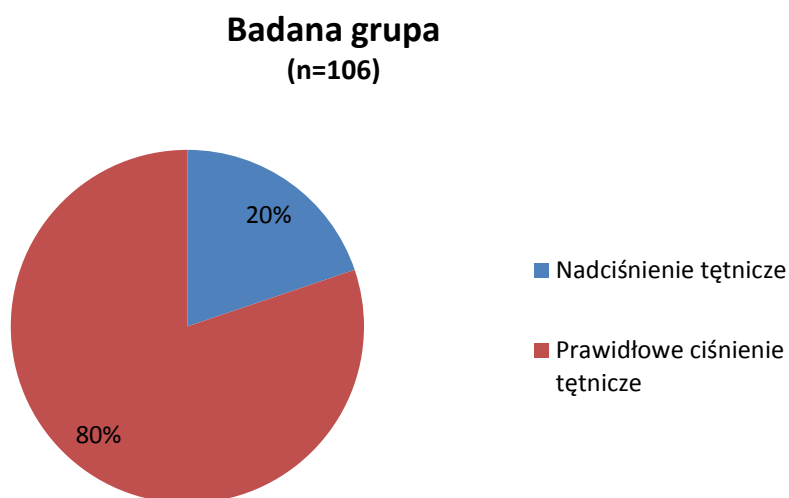
**Ryc. 20 Występowanie zespołu policystycznych jajników u pacjentek z poszczególnymi wariantami polimorfizmu BclI genu GR ( $p < 0,05$ )**



**Ryc. 21** Występowanie zespołu policystycznych jajników u pacjentek z poszczególnymi wariantami polimorfizmu N363S genu GR (test 2-stronny  $p < 0,05$ ).

#### 4.10 Ciśnienie tętnicze

W analizowanej grupie średnia wartość ciśnienia tętniczego wynosiła  $128 \pm 18,6$ . U 21 pacjentek podczas pomiaru ciśnienia tętniczego jego spoczynkowa wartość przekraczała 140/90 mmHg. Nie stwierdzono związku badanych polimorfizmów z poziomem ciśnienia tętniczego ( $p > 0,05$ ).



**Ryc. 22** Częstość występowania nadciśnienia tętniczego w badanej grupie.

## 5. DYSKUSJA

Glikokortykosteroidy zawdzięczają swoją nazwę udziałowi w procesach przemian białek i tłuszczów w glukozę podczas indukowanego stresem pobudzenia osi przysadkowo-podwzgórzowej [68]. Hormony te oddziałują na każdą komórkę organizmu i wpływ ten odbywa się poprzez receptor jądrowy [30]. Glikokortykosteroidy regulują ekspresję prawie 10% genów w naszym organizmie [69]. Są one kluczowymi regulatorami homeostazy i przygotowują organizm na fizyczny i psychiczny stres [70], są też istotnymi regulatorami procesów odpornościowych i zapalnych. Nadmiar hormonów sterydowych prowadzi do nieprawidłowego rozmieszczenia tkanki tłuszczowej ze szczególnie charakterystycznym depozytem w obrębie tułowia, twarzy i karku. Nadmierny katabolizm białek prowadzi do zaników mięśniowych i osłabienia, pojawia się hiperglikemia, oporność na insulinę i cukrzyca a także nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemia, inne zaburzenia lipidowe i retencja wody. Często występuje osteoporoza, zaburzenia miesiączkowania, pojawiają się zaburzenia mechanizmów odpornościowych oraz skłonność do depresji a także zaburzenia funkcji poznawczych [18, 69, 71].

Poza ewidentną hiperkortyzolemią wpływ na wzrost ryzyka pojawienia się wyżej wymienionych chorób ma także wrażliwość samego receptora na glikokortykosteroidy. Stopień wrażliwości receptora GR może być uwarunkowany obecnością rzadkich mutacji punktowych, delecji lub też polimorfizmów genu *GR*, które wpływają na koncentrację receptora wewnątrz komórki oraz jego biologiczną aktywność [72, 73, 74]. Ma to szczególne znaczenie nie tylko w patogenezie wielu chorób, ale także przy podejmowaniu decyzji dotyczących skutecznych terapii. Jednym z przykładów różnej reakcji na glikokortykosteroidy jest wrażliwość na leczenie sterydami w ostrej białaczce limfoblastycznej. Glikokortykosteroidy nasilają apoptozę limfocytów, co hamuje ich rozplam, ale część chorych wykazuje oporność na leki sterydowe i nie odpowiada na ten sposób leczenia [75]. Do tej pory opisano około 2600 polimorfizmów genu *GR* (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NR3C1>), przy czym uważa się, że polimorfizmy: N363S, BclI, ER22/E23K, A3669G i D401H mają istotny wpływ promujący bądź chroniący przed otyłością i zespołem metabolicznym [53, 76, 77].

W niniejszych badaniach skupiono się nad związkiem polimorfizmów genu *GR* z przebiegiem otyłości u młodych kobiet analizując dwa polimorfizmy związane ze wzrostem wrażliwości receptora na glikokortykosteroidy stąd sprzyjające otyłości (N363S, BclI) i dwa, które zmniejszają wrażliwość receptora (ER22/E23K, A3669G) w związku z tym powinny mieć wpływ na łagodniejszy przebieg schorzenia.

### 5.1 Polimorfizm N363S genu *GR/NR3C1*

Koper i wsp. opisał polimorfizm genu *GR* zlokalizowany w pozycji 1220 (AAT>AGT) w kodonie 363 powodujący zamianę asparaginy na serynę (N363S) w obrębie domeny transaktywacyjnej receptora. Obecność seryny w tym miejscu może prowadzić do zwiększonej fosforylacji białka i w konsekwencji do zwiększonej aktywności receptora. [78,79]. Częstość występowania tego polimorfizmu w populacjach europejskich wynosi od 2,3 do 9,3% [40, 41, 42, 44, 46, 80, 81, 82]. Częstość występowania tego polimorfizmu w populacji polskiej oscyluje około 10% [83]. W obu badanych w tej pracy grupach częstość pojawiania się tego polimorfizmu była podobna i wynosiła 10,4% w grupie badanej i 7,9% w grupie kontrolnej.

W opublikowanych do tej pory badaniach wykazano m.in., że obecność polimorfizmu N363S genu *GR* zwiększa predyspozycję do wyższej masy ciała a co za tym idzie także i BMI. Tego typu zależność potwierdzono w badaniach przeprowadzonych we Włoszech, Francji i w Australii (badając Australijczyków pochodzenia brytyjskiego), ale nie udowodniono w badaniach wykonywanych w Danii, Szwecji czy USA [41, 46, 80, 82, 84, 85].

Nosiciele polimorfizmu N363S genu *GR* mogą także charakteryzować się zwiększonym stężeniem cholesterolu we krwi [80].

Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań populacyjnych nad związkiem polimorfizmu N363S genu *GR/NR3C1* z otyłością i zespołem metabolicznym przedstawiono w tabeli 41.

W badaniach tych poza zależnością masy ciała, BMI oraz hipercholesterolemii od obecności polimorfizmu N363S, wykazano także prawdopodobny związek tego polimorfizmu z obecnością innych zaburzeń gospodarki lipidowej jak podwyższony poziom trójglicerydów, podwyższony poziom współczynnika cholesterol całkowity/HDL [40, 43, 51]. W jednym z badań zwrócono także uwagę na wzrost

wydzielania insuliny u osób obarczonych tym polimorfizmem, ale w innych badaniach nie potwierdzono związku z występowaniem cukrzycy typu 2 czy innymi zaburzeniami gospodarki węglowodanowej [42, 44].

Zwraca także uwagę odmienna predyspozycja do wyższego WHR u mężczyzn i kobiet w związku z obecnością polimorfizmu N363S genu GR. Dobson i wsp. wykazali, że polimorfizm ten tylko u mężczyzn wiąże się z podwyższeniem tego parametru [44].

**Tab. 41 Wyniki badań populacyjnych nad związkiem polimorfizmu N363S genu GR/NR3C1 z otyłością i zespołem metabolicznym.**

<b>Badana populacja</b>	<b>Wykazany związek z polimorfizmem N363S</b>	<b>Publikacja</b>
216 Holendrów (kobiet i mężczyzn), 13 heterozygot AG	Wzrost wrażliwości receptora GR, zwiększone wydzielanie insuliny, zwiększone BMI	Huizenga 1998 [40]
124 chorych z nadciśnieniem tętniczym i 195 osób bez nadciśnienia tętniczego	Wzrost BMI	Lin 1999 [41]
491 osób	Brak zależności z BMI	Hallsall 2000 [89]
240 kobiet i 135 mężczyzn	Wzrost WHR u mężczyzn, brak zależności z BMI, zaburzeniami lipidowymi i gospodarką węglowodanową	Dobson 2001[44]
284 mężczyzn ze Szwecji	Brak zależności z BMI i wrażliwością na glikokortykosteroidy	Rosmond 2001 [45]
741 otyłych mężczyzn z Danii i 854 osoby z grupy kontrolnej	Brak zależności z BMI, WHR i wzrostem masy ciała	Echwald 2001 [46]
437 chorych (Anglo-Celtów) z ch.n.s. i 302 osoby z grupy kontrolnej	Związek z ch.n.s., podwyższonym poziomem cholesterolu, triglicerydów, i współczynnika cholesterol całkowity/HDL	Lin 2003 [43]
951 Anglo-Celtów i Europejczyków z północy	Związek z występowaniem otyłości i nadwagi, ale brak związku z nadciśnieniem tętniczym czy cukrzycą typu 2	Lin 2003 [42]

cd. tabeli 41

<b>Badana populacja</b>	<b>Wykazany związek z polimorfizmem N363S</b>	<b>Publikacja</b>
185 otyłych kobiet i 94 otyłych mężczyzn	Związek z wyższym BMI, w połączeniu z BcII większe stężenie cholesterolu	Di Blasio 2003 [80]
369 chorych z Francji z cukrzycą typu 2	Większa częstość nadwagi, większe BMI u mężczyzn	Roussel 2003 [82]
142 mężczyzn 153 kobiety populacji południowo-azjatyckiej	Mniejsze ryzyko otyłości w porównaniu z Europejczykami	Syed 2004 [47]
552 uczestników w wieku powyżej 85 lat	Zwiększone stężenie cholesterolu LDL oraz trójglicerydów; brak związku z chorobami układu sercowo-naczyniowego.	Kuningas 2006 [51]

Wyniki badań własnych przeprowadzonych w grupie otyłych kobiet w wieku 20-45 lat wykazały, że obecność rzadszego wariantu AG N363S genu receptora GR sprzyjała występowaniu wyższej masy ciała i wyższemu BMI a także wyższej zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie. Częściej także w tej grupie pojawiały się generalnie ujęte zaburzenia lipidowe o różnorodnym charakterze. Nie wykazano jednak związku polimorfizmu N363S genu GR z obwodem brzucha, szczególnie ujętymi parametrami gospodarki lipidowej (cholesterol całkowity, cholesterol LDL i HDL oraz trójglicerydy) a także z parametrami gospodarki węglowodanowej czy wskaźnikiem insulinooporności. Nie stwierdzono także związku ze stężeniem hsCRP czy ACTH i kortyzolu we krwi i w moczu. Brak tych korelacji może być związany z mimo wszystko małą liczbowo grupą badanych, a być może także specyfiką populacji (jako, że w piśmiennictwie wykazywano różnice pomiędzy poszczególnymi populacjami – tabela nr 42) i faktem, że badania były wykonywane tylko u kobiet (*co jak wykazano może mieć znaczenie – Roussel 2003*) [82]. Nie wykazano korelacji pomiędzy badanym polimorfizmem a wysokością ciśnienia tętniczego krwi, co potwierdza wyniki dotychczas opublikowane [43, 51].



## 5.2 Polimorfizm BclI

Polimorfizm BclI jest związany z obecnością miejsca restrykcyjnego dla enzymu restrykcyjnego BclI po raz pierwszy oczyszczonego z bakterii *Bacillus caldolyticus* w 1978 roku [86]. Jego lokalizacja wiąże się z obecnością palindromowej sekwencji nukleotydów: 5'-TGATCA-3'. Polimorfizm ten polega na zamianie cytozyny na guaninę w odległości 646 nukleotydów od eksonu 2 w intronie B [84]. Częstość występowania wariantu BclI w grupie pochodzącej z populacji polskiej (70 zdrowych osób) oceniana jest następująco: GG 13%, CG 47% oraz CC 40% [83]. W grupie kontrolnej/grupie badanej w niniejszej pracy kształtuje się nieco odmiennie tzn. dla wariantu GG odpowiednio 22,8/14,1%, wariantu CG 45,5/60,4% i dla wariantu CC 31,7/25,5% przy czym cytowana grupa i grupy poddane badaniu w tej pracy są ciągle zbyt niewielkimi populacjami do wiarygodnej oceny statystycznej, stąd trudno wyciągać z tych różnic istotne wnioski.

Przeprowadzono do tej pory kilka badań dotyczących powiązania tego polimorfizmu z otyłością brzuszną i opornością na insulinę [35, 36].

Wykazano także, że osoby homozygotyczne pod względem tego polimorfizmu posiadają wyższe BMI i WHR, wyższe stężenie leptyny i wyższe skurczowe ciśnienie tętnicze krwi [87]. Wykazano ten związek dla populacji szwedzkiej, czego np. nie udowodniono dla polimorfizmu N363S również sprzyjającego wzrostowi wrażliwości na glikokortykosteroidy [45]. W przeprowadzanych badaniach zwraca także uwagę fakt częstych różnic w wykazanych związkach pomiędzy polimorfizmem BclI a składowymi zespołu metabolicznego u kobiet i mężczyzn oraz w różnych grupach wiekowych [88].

W tabeli 42 zawarto wyniki dotychczasowych badań nad związkiem obecności polimorfizmu BclI i obecnością cech zespołu metabolicznego.

**Tabela 42 Wyniki badań populacyjnych nad związkiem polimorfizmu Bcll genu GR/NR3C1 z otyłością i zespołem metabolicznym.**

<b>Badana populacja</b>	<b>Wykazany związek z polimorfizmem Bcll</b>	<b>Publikacja</b>
56 otyłych kobiet i 43 kobiety z prawidłowym BMI w okresie przedmenopauzalnym	Hiperinsulinemia u otyłych, bez związku z otyłością	Weaver 1992 [36]
80 otyłych rodzin	Tendencja do otyłości	Clément 1996[90]
79 mężczyzn i 73 kobiety	Zwiększona ilość tłuszczu trzewnego homozygot z prawidłowym BMI, bez związku z nadwagą u homozygot	Buemann 1997 [35]
64 mężczyzn	Bez związku z BMI	Panarelli 1998 [91]
284 Szwedów	Wyższe BMI, WHR, zwiększone stężenie leptyny	Rosmond 2000 [87]
12 monozygotycznych par bliźniąt	Zwiększona masa ciała, zwiększona zawartość tłuszczu trzewnego i cholesterolu w odpowiedzi na dietę bogatokaloryczną	Ukkola 2001 [92]
322 mężczyzn, 420 kobiet	Zwiększona zawartość tłuszczu trzewnego	Ukkola 2001 [34]
185 otyłych kobiet, 94 otyłych mężczyzn	W połączeniu z polimorfizmem N363S większe stężenie cholesterolu i tendencja do wyższego ciśnienia tętniczego	Di Blasio 2003 [80]
3 grupy pacjentów w zaawansowanym wieku-grupa 1: 197 mężczyzn i kobiet, grupa 2 1963 mężczyzn i kobiet, grupa 3: 400 mężczyzn	Mniejsze BMI, tendencja do mniejszej beztłuszczowej masy ciała, bez związku z zawartością tłuszczu u nosicieli allelu G	van Rossum 2003 [84]
563 Holendrów powyżej 85 roku życia	Bez związku ze stężeniem kortyzolu, CRP, HDL, LDL, trójglicerydów oraz HbA1c	Kuningas 2006 [51]
325 mężczyzn	Większe stężenie insuliny na czczo, insulinooporność u mężczyzn	Syed 2008 [39]
284 pacjentów w wieku między 13 a 36 rokiem życia oraz 235 pacjentów w wieku od 8-14 lat	W populacji młodszych pacjentów allel G związany z większą masą ciała, zawartością tłuszczu w organizmie, wyższym BMI, bez związku w starszej grupie	Voorhoeve 2009 [88]
1228 pacjentów	Większa zawartość tłuszczu w organizmie oraz większy wskaźnik insulinooporności HOMA-IR u homozygot GG	Geelen 2013 [93]

W badaniach własnych obecność polimorfizmu BclI zarówno w formie heterozygotycznej jak i homozygotycznej nie wiązała się szczególnie z żadnymi parametrami typu: masa i skład masy ciała czy gospodarki lipidowej i węglowodanowej. Nie miała też wpływu na wskaźniki insulinooporności czy stężenie ACTH i kortyzolu we krwi. Być może wiąże się to z faktem, że grupa badana liczyła tylko 106 osób lub też wiąże się to z odmienną charakterystyką genetyczną populacji, z której pochodziła ta grupa. Brak związku polimorfizmu BclI z BMI, stężeniem kortyzolu czy parametrami gospodarki lipidowej opisywali też inni badacze [51, 91]. Van Rossum i wsp. stwierdzili wręcz, że nosiciele allelu G mają tendencje do niższego BMI, ale i do niższej beztłuszczowej masy ciała [84].

### **5.3 Polimorfizm ER22/23EK**

Polimorfizm ten, skutkujący zamianą argininy na lizynę w pozycji 200 receptora GR, występuje stosunkowo rzadko. W niniejszej pracy częstość ta u kobiet w grupie kontrolnej wynosiła 3% a w grupie badanej 6,6%. W populacji badanej przez Koeijvaetes i wsp. częstość występowania heterozygot ER22/23EK wynosiła 7% u kobiet i 8,4 % u mężczyzn. Mężczyźni, u których występował wariant polimorficzny genu GR byli wyżsi i smuklejsi, ale nie dotyczyło to kobiet [94]. Dlaczego występowała ta różnica fenotypowa u obu płci? Do tej pory nie zostało to wyjaśnione. Podejrzewa się, że wysoki poziom krążących estrogenów u kobiet niweluje pozytywny wpływ tego polimorfizmu na reakcję receptora GR na sterydy [49]. W badaniach prowadzonych przez van Rossum i wsp. stwierdzono, że nie ma różnic w stężeniu kortyzolu pomiędzy nosicielami polimorfizmu ER22/23EK a osobami, u których występuje typ dziki, natomiast istniała wyraźna różnica w stężeniu kortyzolu w teście z deksametazonem, kiedy to nosiciele wykazywali znacznie wyższy poziom kortyzolu niż osoby nieobarczone polimorfizmem. Wskazywało to wyraźnie na występowanie niewielkiego stopnia oporności na glikokortykosteroidy u nosicieli polimorfizmu. Wykazano także tendencję do niższego stężenia insuliny na czczo i niższego wskaźnika HOMA-IR i HOMA dla funkcji komórki beta trzustki u nosicieli polimorfizmu, nie było jednak różnicy w stężeniu glukozy we krwi na czczo. Stężenie całkowitego cholesterolu i cholesterolu LDL we krwi u nosicieli było także niższe, nie stwierdzono tego w odniesieniu do stężenia trójglicerydów i HDL [95].

Wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowane w tej pracy wykazały, że heterozygotyczne nosicielki polimorfizmu ER22/23EK wykazywały mniejszą tendencję do zaburzeń gospodarki lipidowej, ale prezentowały wyższą masę ciała i częściej pojawiała się u nich insulinooporność. Nie do końca pozostaje to w zgodzie z badaniami przeprowadzonymi przez Van Rossum i wsp. [76, 95]. Prawdopodobnie można to tłumaczyć efektem tłumienia oporności na sterydy, który pojawia się u kobiet i może być związany z wysokim stężeniem hormonów estrogennych przed menopauzą, o czym wspomniano wcześniej [49]. Jest także prawdopodobne, że statystyka została tu w pewien sposób zmieniona i nie do końca jest wiarygodna ze względu na małą liczbę nosicielek mutacji (tylko u siedmiu pacjentek wykazano obecność polimorfizmu ER22/23EK). Wyniki badań populacyjnych nad związkiem polimorfizmu ER22/23EK genu GR/NR3C1 z otyłością i zespołem metabolicznym przedstawiono w tabeli 43.

**Tabela 43. Wyniki badań populacyjnych nad związkiem polimorfizmu ER22/23EK genu GR/NR3C1 z otyłością i zespołem metabolicznym.**

<b>Badana populacja</b>	<b>Wykazany związek z polimorfizmem ER22/23EK</b>	<b>Publikacja</b>
202 zdrowe osoby	Mniejsze hamowanie w teście z 1 mg deksametazonu sugerujące oporność na GS, mniejsze stężenie insuliny na czczo, mniejsze stężenie cholesterolu LDL, większa częstość występowania polimorfizmu u starszych	van Rossum 2002 [96]
402 starszych mężczyzn	Mniejsze stężenie CRP, tendencja do niższego stężenia cholesterolu całkowitego i LDL, długowieczność.	van Rossum 2004 [95]
350 pacjentów pomiędzy 13 a 36 rokiem życia	Smuklejszy wzrost u młodych mężczyzn, bez wpływu na BMI u mężczyzn, większa zawartość beztłuszczowej masy ciała i siła u mężczyzn, tendencja do mniejszego obwodu w talii u kobiet	van Rossum 2004 [76]
563 Holendrów powyżej 85 roku życia	Zwiększony poziom HbA1C, tendencja do zwiększenia CRP	Kuningas 2006 [51]
300 kobiet z niepowikłanym przebiegiem ciąży	U heterozygotycznych pacjentów mniejszy wzrost BMI w trakcie ciąży oraz mniejszy przyrost masy ciała	Bertalan R 2009 [97]

#### 5.4 Polimorfizm A3669G (c.3669A/G)

Polimorfizm A3669G (c.3669A/G) jest zlokalizowany w eksonie  $\beta$  i jego obecność prawdopodobnie wiąże się ze zwiększoną ekspresją wariantu  $\beta$  receptora GR, który to wariant hamuje aktywność transkrypcyjną wariantu GR  $\alpha$  [80,74,96,98]. U nosicieli tego polimorfizmu stwierdza się lepszy profil lipidowy u mężczyzn i korzystniejszy skład masy ciała u kobiet [80,96]. W badaniach własnych stwierdzono, że nosicielki wariantu AG mają niższe stężenie cholesterolu we krwi a nosicielki wariantu GG mniejszą beztłuszczową masę ciała, co może potwierdzać ochronny wpływ polimorfizmu A3669G. Nie wykazano wpływu tego polimorfizmu na parametry gospodarki węglowodanowej oraz stężenie kortyzolu, ACTH czy hsCRP. Wyniki badań populacyjnych nad związkiem polimorfizmu A3669G genu *GR/NR3C1* z otyłością i zespołem metabolicznym zaprezentowano w tabeli 44.

**Tab. 44 Wyniki badań populacyjnych nad związkiem polimorfizmu A3669G genu *GR/NR3C1* z otyłością i zespołem metabolicznym.**

Badana populacja	Wykazany związek z polimorfizmem A3669G	Publikacja
322 pacjentów rasy kaukaskiej i 262 pochodzenia południowo-azjatyckiego	Mniejsza częstość otyłości u Europejki i korzystniejszy profil lipidowy u Europejczyków	Syed AA 2006[61]
7983 osób, populacyjne, prospektywne badanie	Związek ryzyka wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego z genetycznie uwarunkowaną wrażliwością na GK	van den Akker 2008 [60]
61 pacjentów z zespołem Cushinga	Mniejsze ryzyko cukrzycy typu 2	Trementino 2012 [62]

#### 5.5 Zespół policystycznych jajników (PCO)

W ramach badań klinicznych grupa kobiet z otyłością została również poddana ocenie pod kątem obecności zespołu PCO. Istnieją hipotezy mówiące o związku glikokortykosteroidów z rozwojem tego zespołu. Wiadomo także, że w zespole tym często pojawia się oporność na insulinę [99]. W wykonanych badaniach wykazano, że nosicielki polimorfizmu N363S częściej chorują na zespół policystycznych

jajników. W chorych z heterozygotycznym wariantem polimorfizmu BclI (CG) zespół policystycznych jajników występował rzadziej niż u osób z wariantem homozygotycznym CC lub GG. Do tej pory opublikowane dane nie wskazują na szczególny udział tych polimorfizmów w predyspozycji do PCO [100], jednak Valkenburg zwrócił uwagę na to, że polimorfizmy genu GR glikokortykosteroidy mogą mieć związek z zaburzonym wydzielaniem gonadotropin u chorych z PCO i brakiem owulacji [101].

Nie wykazano wpływu żadnego z badanych polimorfizmów na moment pojawienia się otyłości, aczkolwiek założono hipotezę o większej skłonności do otyłości u kobiet ciężarnych z polimorfizmami genu GR predysponującymi do większej wrażliwości receptora GR w obliczu znacznie zwiększonego wydzielania hormonów steroidowych w ciąży. Nie jest wykluczone, że grupa badana była jednak zbyt mała, aby potwierdzić jakiegokolwiek związki tego typu. Niewątpliwie brak w tej pracy również szczegółowej oceny parametrów świadczących o oporności na glikokortykosteroidy takich jak np. reakcja kortyzolu na małą dawkę deksametazonu. Jednak, jak już wspomniano wcześniej, konieczność prowadzenia badań w trzech ośrodkach równolegle i sposób ich organizacji spowodował, że protokół badań nie zawsze był przestrzegany w założony sposób, co uniemożliwiło otrzymanie pełnych, jednolitych i wiarygodnych wyników. Wyniki przeprowadzonych badań zachęcają ewidentnie do ich kontynuacji na dużo większej grupie osób z otyłością i pojawiającymi się w jej wyniku komplikacjami. W tej sytuacji warto by było również pokusić się o ocenę związku poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów z ocenianymi parametrami zespołu metabolicznego i funkcjonowania osi przysadkowo-nadnerczowej.

## 6. WNIOSKI

1. Częstości występowania analizowanych polimorfizmów genu receptora glikokortykosteroidów (GR) nie odbiegają od podawanych częstości dla populacji kaukaskiej.
2. Polimorfizm N363S genu GR wykazuje wyraźny związek z wysokością wskaźnika masy ciała (BMI) i zawartością tłuszczu, co potwierdzają dane do tej pory opublikowane.
3. Obecność polimorfizmu N363S genu GR prawdopodobnie zwiększa ryzyko występowania zaburzeń lipidowych w badanej grupie kobiet z otyłością w okresie przedmenopauzalnym.
4. Obecność polimorfizmów N363S i BclI genu GR występujących w badanej grupie kobiet z otyłością i zespołem policystycznych jajników wskazuje na ich prawdopodobny związek z rozwojem tego zespołu, przy czym hipoteza ta wymaga dalszych badań.
5. Występowanie polimorfizmów genu GR ER22/E23K oraz A3669G (c.3669A/G) zmniejszających wrażliwość receptora na glikokortykosteroidy może mieć związek z mniejszą tendencją do występowania zaburzeń lipidowych w badanej grupie chorych.
6. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na potrzebę kontynuacji badań nad polimorfizmami genu GR w większej grupie kobiet z otyłością celem udowodnienia wyraźnych związków tych polimorfizmów z pojawieniem się i przebiegiem zespołu metabolicznego.

## 7. STRESZCZENIE

Otyłość jest przewlekłą chorobą metaboliczną o rosnącej częstości występowania. Otyłość brzuszna prowadzi do poważnych konsekwencji zdrowotnych, min. chorób układu krążenia, chorób nowotworowych. Znane są przyczyny nabyte otyłości natomiast przyczyny genetyczne są obiektem wielu badań. Badania te dowodzą iż istnieje wiele genów odpowiedzialnych za rozwój otyłości i zaangażowanych w metabolizm tkanki tłuszczowej. Niektóre postaci otyłości wiążą się z hiperkortyzolizmem mimo utrzymywania się kortyzolu w granicach wartości referencyjnych. Próbuje się wyjaśnić to zjawisko nadmierną produkcją kortyzolu w obrębie samej tkanki tłuszczowej lub też jej nadmierną wrażliwością na glikokortykosteroidy (GS, ang. *glucocorticosteroids*). W przypadku hiperkortyzolemii jedną z typowych cech klinicznych jest akumulacja tkanki tłuszczowej w rejonie brzucha (tzw. otyłość brzuszna). Glikokortykosteroidy wywierają swój wpływ na metabolizm komórek za pośrednictwem receptora glikokortykosteroidowego (GR ang. *glucocorticosteroid receptor*). Różne warianty genu GR mogą wpływać na nadmierną wrażliwość lub oporność receptora na glikokortykosteroidy. Od kilku lat podkreśla się znaczenie tych wariantów w rozwoju otyłości, nadciśnienia tętniczego czy też podatności na chorobę niedokrwienną serca.

Celem pracy była ocena występowania polimorfizmów genu receptora glikokortykosteroidów u otyłych kobiet i ich korelacja z wybranymi komponentami zespołu metabolicznego.

U 106 otyłych kobiet w wieku 20-45 lat oraz 101 kobiet bez otyłości stanowiących grupę kontrolną oceniano występowania polimorfizmów GR przy pomocy technologii Taqman i HRM. Przeprowadzono badania biochemiczne do oceny zaburzeń gospodarki lipidowej i węglowodanowej, badania hormonalne, konsultację ginekologiczną i analizę składu masy ciała metodą bioimpedancji.

Analizie poddano cztery polimorfizmy: dwa związane ze zwiększoną wrażliwością receptora glikokortykosteroidowego (N363S, BclI) oraz dwa związane z opornością na GS (ER 22/23 EK, A3669G). Nie wykazano różnicy w częstości występowania polimorfizmów genu GR w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykazano iż pacjentki z polimorfizmem N363S (heterozygoty AG) mają wyższą masę ciała, BMI oraz wykazują większą procentową zawartość tłuszczu w organizmie w porównaniu do kobiet z wariantem AA. Udowodniono również, że



homozygotyczne nosicielki allelu G polimorfizmu ER22/23 EK charakteryzują się niższą masą ciała oraz wskaźnikiem HOMA IR. Analiza zaburzeń gospodarki lipidowej wykazała, iż kobiety z wariantem AG polimorfizmu A3669G cechowały się mniejszym średnim stężeniem cholesterolu LDL w porównaniu do homozygot AA i GG, natomiast wartość beztłuszczowej masa ciała była istotnie wyższa zarówno u pacjentek z allelem AA jak i AG w porównaniu do chorych z allelem GG.

Potwierdzono związek pomiędzy polimorfizmem N363S a skłonnością do otyłości. Wykazano ochronną rolę polimorfizmu ER22/23EK w odniesieniu do otyłości i insulinooporności oraz podobną zależność pomiędzy polimorfizmem A3669G a korzystniejszym profilem lipidowym (stężenie LDL) i składem ciała mierzonym wartością FFM.

Wykazano częstsze występowanie zespołu policystycznych jajników u kobiet z polimorfizmami zwiększającymi wrażliwość GR na glikokortykosteroidy, tj. z polimorfizmem BcII oraz N363S.

## 8. PIŚMIENICTWO

1. World Health Organization. *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Report of a WHO Consultation*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1999.
2. Alberti G., Zimmet P.Z., Shaw J., Grundy S.M., International Diabetes Federation 2006: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. <http://www.idf.org/webdata/docs/IDF> © International Diabetes Federation, 2007 ISBN 2-930229-49-7
3. Carey DGP, Campbell LV, Chisholm DJ. Is visceral fat (intra-abdominal and hepatic) a major determinant of gender differences in insulin resistance and dyslipidaemia? *Diabetes* 1996;45: 110A.
4. Zdrojewski T, Szpakowski P, Bandosz P, Pajak A, Wiecek A, Krupa-Wojciechowska B. Arterial hypertension in Poland in 2002. *J Hum Hypertens*. 2004;18:557–562.
5. Piwońska A, Piotrowski W, Broda G. Ten-year risk of fatal cardiovascular disease in the Polish population and medical care. Results of the WOBASZ study. *Kardiol Pol*. 2010, 68:672–677.
6. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss An Update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease From the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism *Circulation*. 2006; 113: 898-918
7. Telford RD. Low physical activity and obesity: causes of chronic disease or simply predictors? *Med Sci Sports Exerc*. 2007, 39:1233-40.
8. Drewnowski A, Specter SE. Poverty and obesity: the role of energy density and energy costs. *Am J Clin Nutr*. 2004, 79:6-16.
9. Björntorp P. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? *Obes Rev* 2001, 2: 73-86.
10. Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet*. 1997, 349:1210-3.

11. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Ascherio AL, Stampfer MJ. Birth Weight and Adult Hypertension, Diabetes Mellitus, and Obesity in US Men. *Circulation*. 1996; 94: 3246-3250
12. Leibel RL. Single gene obesities in rodents: possible relevance to human obesity. *J Nutr*. 1997, 127:1908S.
13. Lyon HN, Hirschhorn JN. Genetics of common forms of obesity: a brief overview. *Am J Clin Nutr* July 2005, 82, 1:215-217
14. Skelton JA, Irby MB, Grzywacz J, Miller G: Etiologies of obesity in children: nature and nurture; *Pediatr Clin North Am* 2011; 58: 1333-1354
15. Ljung T, Andersson B, Bengtsson BA, Björntorp P, Mårin P. Inhibition of cortisol secretion by dexamethasone in relation to body fat distribution: a dose-response study. *Obes Res* 1996, 4:277-82.
16. Björntorp P, Rosmond R. Obesity and cortisol. *Nutrition* 2000,16:924-36
17. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988, 37:1595-607.
18. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 2009, 5: 374-381
19. Pasquali R, Biscotti D, Spinucci G, Vicennati V, Genazzani AD, Sgarbi L, Casimirri F: Pulsatile secretion of ACTH and cortisol in premenopausal women: effect of obesity and body fat distribution. *Clin Endocrinol* 1998, 48: 603-612
20. Moyer AE, Rodin J, Grillo CM, Cummings N, Larson LM, Rebuffe-Scrive M: Stress-induced cortisol response and fat distribution in women. *Obes Res* 1994, 2: 255-261
21. Walker BR, Andrew R: Tissue production of cortisol by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type I and metabolic disease. *Ann NY Acad Sci* 2006, 1083: 165-184
22. Clark J.K., Schrader W.T, O'Malley B.W. Mechanism of steroid hormones. *Williams' Textbook of Endocrinology*. JD Wilson & DW Foster, Eds, 1992, 35-90. WB Saunders Co, Philadelphia, USA
23. Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP., Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94: 2692-2701

24. Huang PL. A Comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech* 2009, 2: 231-237
25. Roberge C, Carpentier AC. Adrenocortical dysregulation as a major player in insulin resistance and onset of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, 293: E1465-E147
26. Guido EC, Delorme EO, Clemm DL, Stein RB, Rosen J, Miner JN. Determinants of promoter-specific activity by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 1996, 10: 1178-1190
27. Nicolaidis NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*. 2010, 75:1-12.
28. Encio IJ, Detera-Wadleigh S: The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1991, 266: 7182-7188.
29. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thomson EB, Rosenfeld MG, Evans RM: Primary structure and expression of a functional human glucocorticosteroid receptor cDNA. *Nature* 1985, 318, 635-641.
30. Schimmer BP, Parker KL. Adrenocorticotrophic hormone: adrenocortical steroids and their synthetic analogs. In: Harmam JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *The pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed. New York:McGraw Hill 1996:1649-78.
31. Arai K, Chrousos GP. Hormone- nuclear receptor interaction in health and disease. Glucocorticosteroid resistance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1994;8:317-31
32. Panarelli M, Fraser R. The glucocorticoid receptor and hypertension. *Endocr Res* 1994;20:101-16
33. DeRijk RH, Schaal M, de Kloet ER. Glucocorticoid receptor variants: clinical implication. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;81:103-22
34. Ukkola O, Rosmond BR, Tremblay A, Bouchard C. Glucocorticoid receptor BclI variant is associated with an increased atherogenic profile in response to long-term overfeeding, *Atherosclerosis* 2001, 157: 221–224
35. Buemann B, Vohl MC, Chagnon M, Chagnon YC, Gagnon J, Pérusse L, Dionneet FI. Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticosteroid receptor gene locus. *Obes Res* 1997; 5:186-92

36. Weaver JU, Hitman GA, Kopelman PG. An association between a BclI restriction fragment length polymorphism of the glucocorticosteroid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women. *J Mol Endocrinol* 1992;9:295-300
37. Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, Davidson HR, Connor JM, Lever AF, Fraser R. Abnormalities of glucocorticosteroid metabolism and the renin-angiotensin system: a four corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J Hypertens* 1992;10:473-82
38. Tremblay A, Bouchard L, Bouchard C, Despres JP, Drapeau V, Perusse L. Long-term adiposity changes are related to a glucocorticosteroid receptor polymorphism in young females. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88: 3141-3145
39. Syed AA, Halpin CG, Irving JA, Unwin NC, White M, Bhopal RS, Redfern CP, Weaver JU. A common intron 2 polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with insulin resistance in men. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008, 68:879-84.
40. Huizenga NATM, Koper JW, de Lange P, Pols HAP, Stolk RP, Burger H, Grobbee DE, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SWJ. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:144–151
41. Lin RC, Wang WY, Morris BJ. High penetrance, overweight, and glucocorticoid receptor variant: case control study. *BMJ* 1999, 319: 1337-8
42. Lin RC, Wang XL, Dalziel B, Caterson ID, Morris BJ. Association of obesity, but not diabetes or hypertension, with glucocorticosteroid receptor N363S Variant. *Obes Res* 2003, 11:802-808.
43. Lin RCY, Wang XL, Morris BJ. Association of coronary artery disease with glucocorticoid receptor N363S variant. *Hypertension* 2003, 41:404–407
44. Dobson MG, Redfern CPF, Unwin N, Weaver JU. The N363S Polymorphism of the Glucocorticoid Receptor: Potential Contribution to Central Obesity in Men and Lack of Association with Other Risk Factors for Coronary Heart Disease and Diabetes Mellitus<sup>1</sup>. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86: 2270-2274
45. Rosmond R, Bouchard C, Bjontorp P. Tsp5091 polymorphism in exon 2 of the glucocorticosteroid receptor gene in relation to obesity and cortisol secretion: cohort study. *B Med J* 2001, 322, 652-653

46. Echwald SM, Sørensen TIA, Andersen T, Pedersen O: The Asn363Ser variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with obesity or weight gain in Danish men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001, 25:1563–1565
47. Syed AA, Irving J, Redfern C, Hall AG, Unwin NC, White M, Bhobal RS, Alberti K, Weaver JU: Low prevalence of the N363S polymorphism of the glucocorticosteroid receptor in South Asian living in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:232-235.
48. Morris BJ, Lin RC, Wang XL, Dalziel B, Caterson ID: Response: Central Obesity Is Associated with Glucocorticosteroid Receptor N363S Variant: Big Picture Sheds Light. *Obesity Research* 2003, 11:1607-1069
49. Yudit MR, Cidlowski JA: Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 2001, 15 : 1093 –1103
50. Russcher H, van Rossum E, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SWJ, Koper JW. Increased Expression of the Glucocorticoid Receptor-A Translational Isoform as a Result of the ER22/23EK Polymorphism. *Mol. Endocrinology*, 2005, 19: 1687
51. Kuningas M, Mooijaart SP, Slagboom PE, Westendorp RG, van Heemst D. Genetic variants in the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and cardiovascular disease risk. The Leiden 85-plus Study. *Biogerontology*. 2006, 7:231-8
52. van Winsen LM, Manenschijn L, van Rossum EF, Crusius JB, Koper JW, Polman CH, Uitdehaag BM. A glucocorticoid receptor gene haplotype (TthIII1/ER22/23EK/9beta) is associated with a more aggressive disease course in multiple sclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009, 94:2110-4
53. van Rossum EF, de Jong FJ, Koper JW, Uitterlinden AG, Prins ND, van Dijk EJ, Koudstaal PJ, Hofman A, de Jong FH, Lamberts SW, Breteler MM Glucocorticoid receptor variant and risk of dementia and white matter lesions. *Neurobiol Aging*. 2008, 29:716-23.
54. Oakley RH, Sar M & Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties and putative function. *J Biol Chem* 1996, 271: 9550–9559
55. Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M & Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J of Clin Invest* 1995, 95: 2435–2441.

56. Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM & Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 1999, 274: 27857–27866
57. Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szefer SJ, Surs W, Minshall E, Chrousos GP & Klemm DJ. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J of Exp Med* 1997, 186: 1567–1574.
58. Schaaf MJ & Cidlowski JA. AUUUA motifs in the 3' UTR of human glucocorticosteroid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids* 2002, 67: 627–636.
59. de Castro M, Elliot S, Kino T, Bamberger C, Karl M, Webster E, Chrousos GP. The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticosteroid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol Med* 1996 2: 597-607.
60. van den Akker EL, Koper JW, van Rossum EF, Dekker MJ, Russcher H, de Jong FH, Uitterlinden AG, Hofman A, Pols HA, Witteman JC & Lamberts SW. Glucocorticoid receptor gene and risk of cardiovascular disease. *Arch Intern Med* 2008, 168: 33–39.
61. Syed AA, Irving JA, Redfern CP, Hall AG, Unwin NC, White M, Bhopal RS & Weaver JU. Association of glucocorticoid receptor polymorphism A3669G in exon 9 beta with reduced central adiposity in women. *Obesity* 2006 ,14: 759–764.
62. Trementino L, Appolloni G, Concettoni C, Cardinaletti M, Boscaro M, Arnaldi G: Association of glucocorticoid receptor polymorphism A3669G with decreased risk of developing diabetes in patients with Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2012, 166:35-42
63. Szczepankiewicz A, Leszczyńska-Rodziewicz A, Pawlak J, Rajewska-Rager A, Dmistrzak-Węglarz M, Wilkosc M, Skibinska M, Hauser J: Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with major depression and predominance of depression in the course of bipolar disorder, *J Affect Dis* 2011, 134: 138-144

64. Charmandari E, Ichijo T, Jubiz W, Baid S, Zachman K, Chrousos GP, Kino T. A novel point mutation in the amino terminal domain of the human glucocorticoid receptor (hGR) gene enhancing hGR-mediated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:4963-8.
65. van Rossum EFC, Laberts SWJ: Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their association with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res* 2004, 59: 333-57
66. Zobel A 2008 Unipolar depression and hippocampal volume: impact of DNA sequence variants of the glucocorticosteroid receptor gene. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 2008,147:836-43
67. Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids.* 2005, 70:407-17.
68. Smith SM, Vale VW: The role of the hypothalamic-pituitary adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci* 2006, 8: 383-395
69. Buckingham A, De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M: Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 1998, 19: 269-301
70. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000 21(1):55-89.
71. Whitworth JA, Mangos GJ, Kelly JJ: Cushing, cortisol, and cardiovascular disease. *Hypertension* 2000, 36: 912-6;
72. Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Rorer E, Constantine K, Taylor SI, Chrousos GP. Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J Clin Invest* 1991; 87: 680-686;
73. Karl M, Lamberts SW, Detera-Wadleigh SD, Encio IJ, Stratakis CA, Hurley DM, Accili D, Chrousos GP. Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 76: 683-689;
74. van Rossum EF, Roks PH, de Jong FH, Brinkmann AO, Pols HA, Koper JW, Lamberts SW. Characterization of a promoter polymorphism in the



- glucocorticoid receptor gene and its relationship to three other polymorphisms. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004, 61:573-81.
75. Bachmann PS, Gorman R, Papa RA, Bardell JE, Ford J, Kees UR, Marshall GM, Lock RB. Divergent mechanism of glucocorticoid resistance in experimental models of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2007, 67: 4482-4490
  76. van Rossum EF, Voorhoeve PG, te Velde SJ, Koper JW, Delemarre-van de Waal HA, Kemper HC, Lamberts SW. The ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with a beneficial body composition and muscle strength in young adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004, 89:4004-9.
  77. van Rossum EF, Feelders RA, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Janssen JA, Ester W, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, Pols HA, Koper JW, Lamberts SW. Association of the ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene with survival and C-reactive protein levels in elderly men. *Am J Med*. 2004, 117:158-62.
  78. Koper JW, Stolk RP, de Lange P, Huizenga NA, Molijn GJ, Pols HA, Grobbee DE, Karl M, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW. Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum Genet* 1997,99: 663-668;
  79. Jewell CM, Cidlowski JA: Molecular evidence for a link between the N363S glucocorticoid receptor polymorphism and altered gene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92: 3268-77
  80. Di Blasio AM, van Rossum EFC, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podesta F, Koper JW, Liuzzi A, Lamberts SWJ: The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003, 59: 68–74.
  81. Wüst S, van Rossum EFC, Federenko IS, Koper JW, Kumsta R, Hellhammer DH: Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:565–573
  82. Roussel R, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanne-Chantelot C, Timsit J, Velho G. The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is

- associated with overweight in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003 59:237–241
83. Pietras T, Panek M, Kuprys-Lipinska I, Oszejca K, Wujcik R, Kuna P, Gorski P, Szemraj J. Frequencies of Bcl I, E22E and N363S of h-GR/NR3C1 restriction fragment length polymorphisms of glucocorticoid receptor gene in Polish adult population, *Mol Biol Rep*. 2011, 38: 3953–3958
84. van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, Janssen JA, Brinkmann AO, de Jong FH, Grobbee DE, Pols HA, Lamberts SW. Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003,59:585-92.
85. Melcescu E, Griswold M, Xiang L, Belk S, Montgomery D, Bray M, Del Ben KS, Uwaifo GI, Marshall GD, Koch CA. Prevalence and cardiometabolic associations of the glucocorticoid receptor gene polymorphisms N363S and Bcl I in obese and non-obese black and white Missisipians. *Hormones* 2012, 11: 166-177.
86. Bingham AHA, Atkinson T, Sciaky D, Roberts RJ: Specific endonuclease from *Bacillus caldolyticus*. *Nucl Acid Res* 1978, 5: 3457-3467
87. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Pérusse L, Lindell K, Carlsson B, Bouchard C, Björntorp P. A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes Res*. 2000 8:211-8.
88. Voorhoeve PG, van den Akker EL, van Rossum EF, Koper JW, van Mechelen W, Lamberts SW, Delemarre-van de Waal HA. Glucocorticoid receptor gene variant is associated with increased body fatness in youngsters. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009, 71:518-23
89. Halsall D, Luan J, Hales N, Wareham N, O’Rahilly S 2000 Glucocorticoid receptor variant and body mass index. *Br Med J*
90. Clément K, Philippi A, Jury C, Pividal R, Hager J, Demenais F, Basdevant A, Guy-Grand B, Froguel P. Candidate gene approach of familial morbid obesity: linkage analysis of the glucocorticoid receptor gene. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996, 20:507-12.

91. Panarelli M, Holloway CD, Fraser R, Connell JM, Ingram MC, Anderson NH, Kenyon CJ Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998, 83:1846-52.
92. Ukkola O, Perusse L, Chagnon YC, Despres JP, Bouchard C. Interactions among the glucocorticoid receptor, lipoprotein lipase and adrenergic receptor genes and abdominal fat in the Quebec Family Study. *Int J Obes relat Metab Disord* 2001;25:1332-9
93. Geelen CC, van Greevenbroek MM, van Rossum EF, Schaper NC, Nijpels G, 't Hart LM, Schalkwijk CG, Ferreira I, van der Kallen CJ, Sauerwein HP, Dekker JM, Stehouwer CD, Havekes B. BclI Glucocorticoid Receptor Polymorphism Is Associated With Greater Body Fatness: The Hoorn and CODAM Studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Feb 7. [Epub ahead of print]
94. Koeijvoets K, van Rossum E, Dallinga-Thie GM, Steyerberg EW, Defesche JC, Kastelein J, Lamberts S, Sijbrands E. A functional polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relation to cardiovascular disease risk in familial hypercholesterolemia. *JCEM* 2006, 91: 4131-4136
95. van Rossum EF, Feelders RA, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Janssen JA, Ester W, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, Pols HA, Koper JW, Lamberts SW. Association of the ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene with survival and C-reactive protein levels in elderly men. *Am J Med.* 2004, 117:158-62.
96. van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HA, Lamberts SW. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes.* 2002 Oct;51(10):3128-34.
97. Bertalan R, Patócs A, Boyle B, Rigó J, Rácz K The protective effect of the ER22/23EK polymorphism against an excessive weight gain during pregnancy. *Gynecol Endocrinol* 2009 25:379-82.
98. van Schoor NM, Dennison E, Lips P, Uitterlinden AG & Cooper C: Serum fasting cortisol in relation to bone, and the role of genetic variations in the glucocorticoid receptor. *Clinical Endocrinology* 2007, 67: 871–878.

99. Milutinović DV, Macut D, Božić I, Nestorov J, Damjanović S, Matic G. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hypersensitivity and glucocorticoid receptor expression and function in women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011 Nov;119(10):636-43.
100. Kahsar-Miller M, Azziz R, Feingold E, Witchel SF. A variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with adrenal androgen excess in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2000 Dec;74(6):1237-40.
101. Valkenburg O, Uitterlinden AG, Themmen AP, de Jong FH, Hofman A, Fauser BC, Laven JS. Genetic polymorphisms of the glucocorticoid receptor may affect the phenotype of women with anovulatory polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2011 Oct;26(10):2902-11.

## 9. SPIS TABEL I RYCIN

- Tab. 1** Kryteria rozpoznania zespołu metabolicznego wg WHO (definicja wg WHO, 1999r.)
- Tab. 2.** Kryteria rozpoznawania zespołu metabolicznego wg IDF z 2001r. (definicja wg IDF, 2001r.).
- Tab. 3** Kryteria zespołu metabolicznego wg NCEP-ATPIII z 2005r. u Europejczyków
- Tab. 4** Częstości występowania polimorfizmów genu receptora glikokortykosteroidów w grupie badanej i grupie kontrolnej.
- Tab. 5** Częstość występowania polimorfizmów w populacji badanej oraz ich zgodność z rozkładem Hardy'ego- Weinberga.
- Tab. 6** Wartości średnie  $\pm$ SD, minimalne i maksymalne masy ciała, BMI oraz obwodu w talii w badanej grupie.
- Tab. 7** Związek rodzaju polimorfizmu N363S z masą ciała, BMI oraz obwodem w talii w badanej grupie.
- Tab. 8** Związek rodzaju polimorfizmu Bc11 z masą ciała, BMI oraz obwodem w talii w badanej grupie.
- Tab. 9** Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK z masą ciała, BMI oraz obwodem w talii w badanej grupie.
- Tab. 10** Związek rodzaju polimorfizmu A3669G z masą ciała, BMI oraz obwodem w talii w badanej grupie.
- Tab. 11** Wartości średnie  $\pm$ SD, minimalne i maksymalne stężenia cholesterolu całkowitego, LDL, trójglicerydów oraz HDL w badanej grupie.
- Tab. 12** Związek rodzaju polimorfizmu N363S ze stężeniem cholesterolu całkowitego, LDL, trójglicerydów oraz HDL w badanej grupie.
- Tab. 13** Związek rodzaju polimorfizmu Bc11 ze stężeniem cholesterolu całkowitego, LDL, trójglicerydów oraz HDL w badanej grupie.
- Tab. 14** Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK ze stężeniem cholesterolu całkowitego, LDL, trójglicerydów oraz HDL w badanej grupie.
- Tab. 15** Związek rodzaju polimorfizmu A3669G ze stężeniem cholesterolu całkowitego, LDL, trójglicerydów oraz HDL w badanej grupie.
- Tab. 16** Wartości średnie  $\pm$ SD, minimalne i maksymalne stężenia glukozy na czczo, w 120 minucie w badanej grupie.

- Tab. 17** Związek rodzaju polimorfizmu N363S ze stężeniem glukozy na czczo oraz w 120 minucie OGTT w badanej grupie.
- Tab. 18** Związek rodzaju polimorfizmu Bcll ze stężeniem glukozy na czczo oraz w 120 minucie OGTT w badanej grupie.
- Tab. 19** Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK ze stężeniem glukozy na czczo oraz w 120 minucie OGTT w badanej grupie.
- Tab. 20** Związek rodzaju polimorfizmu A3669G ze stężeniem glukozy na czczo oraz w 120 minucie OGTT w badanej grupie.
- Tab. 21** Wartości średnie  $\pm$ SD, minimalne i maksymalne stężenia insuliny na czczo, w 120 minucie, HOMA-IR, rezerwy insulinowej w grupie badanej
- Tab. 22** Związek rodzaju polimorfizmu N363S ze stężeniem insuliny na czczo, w 120 minucie po OGTT, HOMA IR, rezerwą insulinową w badanej grupie.
- Tab. 23** Związek rodzaju polimorfizmu Bcll ze stężeniem insuliny na czczo, w 120 minucie po OGTT, HOMA IR, rezerwą insulinową w badanej grupie.
- Tab. 24** Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK ze stężeniem insuliny na czczo, w 120 minucie po OGTT, HOMA IR, rezerwą insulinową w badanej grupie.
- Tab. 25** Związek rodzaju polimorfizmu A3669G ze stężeniem insuliny na czczo, w 120 minucie po OGTT, HOMA IR, rezerwą insulinową o w badanej grupie.
- Tab. 26** Wartości średnie  $\pm$ SD, minimalne i maksymalne wartości stężenia kortyzolu porannego o godzinie 8.00 , kortyzolu wieczornego (16.00-18.00) oraz ACTH w badanej grupie.
- Tab. 27** Związek rodzaju polimorfizmu N363S ze stężeniem kortyzolu porannego o godzinie 8.00 , kortyzolu wieczornego (16.00-18.00) oraz ACTH.
- Tab. 28** Związek rodzaju polimorfizmu Bcll ze stężeniem kortyzolu porannego o godzinie 8.00 , kortyzolu wieczornego (16.00-18.00) oraz ACTH w badanej grupie.
- Tab. 29** Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK ze stężeniem kortyzolu porannego o godzinie 8.00 , kortyzolu wieczornego (16.00-18.00) oraz ACTH w badanej grupie.

- Tab. 30** Związek rodzaju polimorfizmu A3669G ze stężeniem kortyzolu porannego o godzinie 8.00 , kortyzolu wieczornego (16.00-18.00) oraz ACTH w badanej grupie.
- Tab. 31** Wartości średnie  $\pm$ SD, minimalne i maksymalne stężenia hsCRP w badanej grupie.
- Tab. 32** Związek rodzaju polimorfizmu N363S ze stężeniem hsCRP.
- Tab. 33** Związek rodzaju polimorfizmu Bcll ze stężeniem hsCRP w badanej grupie.
- Tab. 34** Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK ze stężeniem hsCRP w badanej grupie.
- Tab. 35** Związek rodzaju polimorfizmu A3669G ze stężeniem hsCRP w badanej grupie.
- Tab. 36** Wartości średnie  $\pm$ SD, minimalne i maksymalne wartości zawartości tłuszczu w organizmie, wody pozakomórkowej i masy beztłuszczowej.
- Tab. 37** Związek rodzaju polimorfizmu N363S z zawartością tłuszczu w organizmie, wody pozakomórkowej oraz masy beztłuszczowej w badanej grupie.
- Tab. 38** Związek rodzaju polimorfizmu Bcll z zawartością tłuszczu w organizmie, wody pozakomórkowej oraz masy beztłuszczowej w badanej grupie.
- Tab. 39** Związek rodzaju polimorfizmu ER22/23EK z zawartością tłuszczu w organizmie, wody pozakomórkowej oraz masy beztłuszczowej w badanej grupie.
- Tab. 40** Związek rodzaju polimorfizmu A3669G z zawartością tłuszczu w organizmie, wody pozakomórkowej oraz masy beztłuszczowej w badanej grupie.
- Tab. 41** Wyniki badań populacyjnych nad związkiem polimorfizmu N363S genu GR/NR3C1 z otyłością i zespołem metabolicznym.
- Tab. 42** Wyniki badań populacyjnych nad związkiem polimorfizmu Bcll genu GR/NR3C1 z otyłością i zespołem metabolicznym.
- Tab. 43** Wyniki badań populacyjnych nad związkiem polimorfizmu ER22/23EK genu GR/NR3C1 z otyłością i zespołem metabolicznym.
- Tab. 44** Wyniki badań populacyjnych nad związkiem polimorfizmu A3669G genu GR/NR3C1 z otyłością i zespołem metabolicznym.

- Ryc. 1** Występowanie nadwagi i otyłości u kobiet w Polsce
- Ryc. 2** Występowanie nadwagi i otyłości u mężczyzn w Polsce.
- Ryc. 3** Schemat budowy genu receptora glikokortykosteroidów (GR/N3CR1)
- Ryc. 4** Schemat budowy receptora GR
- Ryc. 5** Chromatogram odczytu dla polimorfizmu Bcll
- Ryc. 6** Chromatogram odczytu dla polimorfizmu N363S
- Ryc. 7** Schemat krzywej topnienia przy oznaczaniu polimorfizmu genu receptora glikokortykosteroidów ER22/23EK- heterozygota AG
- Ryc. 8** Schemat krzywej topnienia przy oznaczaniu polimorfizmu genu receptora glikokortykosteroidów ER22/23EK- homozygota GG
- Ryc. 9** Średnie wartości masy ciała u pacjentek z polimorfizmem N363S
- Ryc. 10** Średnia wartość BMI u pacjentów z polimorfizmem N363S
- Ryc. 11** Średnie wartości masy ciała u pacjentek z polimorfizmem ER22/23EK
- Ryc. 12** Zaburzenia lipidowe w grupie badanej
- Ryc. 13** Średnie stężenie frakcji LDL cholesterolu u pacjentek z polimorfizmem A3669G
- Ryc. 14** Zaburzenia lipidowe u pacjentek z polimorfizmami AA i AG N363S w badanej grupie
- Ryc. 15** Zaburzenia gospodarki węglowodanowej w badanej grupie
- Ryc. 16** Średnia wartość wskaźnika HOMA IR u pacjentek w grupie ER22/23 EK
- Ryc. 17** Stężenie insuliny na czczo u pacjentek z polimorfizmem ER22/23 EK
- Ryc. 18** Beztłuszczowa masa ciała u pacjentek z polimorfizmem A3669G
- Ryc. 19** Moment pojawienia się otyłości w badanej grupie
- Ryc. 20** Występowanie zespołu policystycznych jajników u pacjentek z poszczególnymi wariantami polimorfizmu Bcll genu GR
- Ryc. 21** Występowanie zespołu policystycznych jajników u pacjentek z poszczególnymi wariantami polimorfizmu N363S genu GR
- Ryc. 22** Częstość występowania nadciśnienia tętniczego w badanej grupie



## 10. ABSTRACT

The frequency of obesity - a chronic metabolic disease is still increasing. Abdominal obesity leads to serious morbidities e.g. cardiovascular diseases, cancer etc. The causes of acquired obesity are well known but genetic ones are still aim of researches. There are many different genes, which control fat tissue metabolism, responsible for the obesity development. Different types of obesity are associated with hypercortisolism despite the normal cortisol level. Some researches explain this phenomenon by excessive production of cortisol within adipose tissue itself or its excessive sensitivity to glucocorticoids. One of the typical clinical features of hypercortisolism is the accumulation of fat in the abdominal area (called abdominal obesity). Glucocorticoid hormones require glucocorticoid receptor (GR) to influence on the human body cells metabolism. GR gene variants may affect the sensitivity or resistance of the glucocorticoid receptor. The importance of these variants on development of obesity, hypertension or susceptibility to ischemic heart disease has been emphasized for a several years. The aim of this study was to evaluate the prevalence of polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene in obese women and their correlation with selected components of metabolic syndrome. The occurrence of GR polymorphisms was evaluated in 106 obese women aged 20-45 and 150 women without obesity (control group) using Taqman technology and HRM. Biochemical and hormonal tests were performed to evaluate disorders of lipid and carbohydrate metabolism. Gynecological consultation and analysis of the composition of body weight by densitometry were also performed. Four different polymorphisms have been analyzed: two associated with increased sensitivity of the glucocorticoid receptor (N363S, BclI) and two associated with resistance to GS (ER 22/23 EK, A3669G). There were no significant differences in the incidences of GR gene polymorphisms in the study group compared to the control group. Analysis of patients with N363S polymorphism (heterozygous AG) revealed a higher body weight, BMI, and a higher percentage of body fat compared to women with the AA variant. The homozygous carriers of the G allele polymorphism of ER 22/23 EK had a lower body weight and HOMA IR. Analysis of lipid disorders demonstrated that women with AG polymorphism A3669G variant were characterized by a lower mean LDL cholesterol levels compared to AA and GG homozygotes, and the value of the FFM is significantly higher in patients with both alleles AG and AA as compared to patients with the GG allele. The study revealed the relationship between the N363S

polymorphism and the susceptibility to obesity. The protective role of ER22/23EK polymorphism in relation to obesity and insulin resistance has been indicated. The similar relationship between the polymorphism A3669G and lipid profiles (LDL level) and body composition (value of the FFM) has been found. The study revealed a higher incidence of polycystic ovaries in women with BclI and N363S GR polymorphism.

## 11. WYKAZ NORM LABORATORYJNYCH

Wykaz norm laboratoryjnych dla badań hormonalnych (Centralne Laboratorium Analityczno- Biochemicznym Szpitala Klinicznego im. H Świącickiego w Poznaniu oraz Pracownia Endokrynologii Molekularnej Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych) przedstawiono poniżej.

<b>Parametr</b>	<b>Wartości referencyjne</b>
ACTH pg/ml	0-60,0
kortyzol 8.00 nmol/l	171-536
kortyzol 16.00-18.00 nmol/l	64-327
Insulina na czczo $\mu$ U/ml	3-17
Kortyzol w dobowej zbiórce moczu nmol/24 godz.	100-379
Prolaktyna	70-510 $\mu$ UI/ml
Testosteron	0,02-3,1 pg/ml
FSH	3,5-12 $\mu$ UI/ml
LH	2,5-12 $\mu$ UI/ml
Estradiol	12,5-166 pg/ml