

Lek. Monika Gołąb

**Analiza występowania mutacji i polimorfizmów
genów receptorów wybranych hormonów
u kobiet z otyłością**

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Promotor

Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Ziemnicka

Promotor Pomocniczy

Dr n. med. Bartłomiej Budny

Wydział Lekarski

**Katedra i Klinika Endokrynologii,
Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu**

Poznań 2019

Gorące podziękowania dla Pani Profesor Katarzyny Ziemnickiej za wiarę, siłę i wsparcie, bez którego nie powstałaby ta praca .

Panu dr. Bartłomiejowi Budnemu za entuzjazm i pomoc merytoryczną udzieloną w trakcie realizacji projektu

Serdecznie dziękuję pani Urszuli Szymańskiej, dr n.med Małgorzacie Kałużnej, dr n.med Katarzynie Wachowiak-Ochmańskiej za nieocenioną pomoc w gromadzeniu materiału do niniejszej pracy oraz paniom Elżbiecie Wrotkowskiej i Małgorzacie Ostrowskiej-Malczewskiej za cierpliwość, skrupulatność i życzliwość

Pracę dedykuję Rodzinie i tym, którzy zawsze we mnie wierzyli.

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ SKRÓTÓW	- 5
2. WSTĘP	- 9
2.1 Definicja otyłości	- 9
2.2 Patogeneza otyłości	- 10
2.3 Otyłość jako konsekwencja zaburzeń hormonalnych	- 12
2.4 Czynniki genetyczne w rozwoju otyłości	- 16
3. CEL PRACY	- 19
4. MATERIAŁ I METODY	- 20
4.1 Grupa badana i grupa kontrolna	- 20
4.2 Metodyka badań klinicznych	- 23
4.3 Metodyka badań biochemicznych i hormonalnych	- 23
4.4 Metodyka badań genetycznych	- 26
5. WYNIKI BADAŃ	
5.1 Wyniki badań biochemicznych i hormonalnych	- 32
5.2 Wyniki badań genetycznych	- 37
5.2.1 Receptory jądrowe	
5.2.1.1 Receptory estrogenów – geny <i>ESR1</i> i <i>ESR2</i>	- 37
5.2.1.2 Receptor androgenów- gen <i>AR</i>	- 40
5.2.1.3 Receptor mineralokortykoidów – gen <i>NR3C2</i>	- 43
5.2.2 Receptory związane z białkiem G	
5.2.2.1 Receptor beta-3-adrenergiczny – gen <i>ADRB3</i>	- 43
5.2.2.2 Receptor melanokortyny – gen <i>MC4R</i>	- 46
5.2.3 Receptory związane z kinazą tyrozynową	
5.2.3.1 Receptor insuliny – gen <i>INSR</i>	- 46
5.2.3.2 Receptor insulino-podobnego czynnika wzrostu 1 - 52	- 52
	– gen <i>IGF1R</i>
5.2.4 Podsumowanie wyników	- 59
6. OMÓWIENIE I DYSKUSJA	- 61
6.1 Receptory jądrowe	
6.1.1 Receptory estrogenów – geny <i>ESR1</i> i <i>ESR2</i>	- 62
6.1.2. Receptor androgenów- gen <i>AR</i>	- 63
6.1.3 Receptor mineralokortykoidów – gen <i>NR3C2</i>	- 65
6.2 Receptory związane z białkiem G	
6.2.1 Receptor beta-3-adrenergiczny – gen <i>ADRB3</i>	- 66
6.2.2 Receptor melanokortyny – gen <i>MC4R</i>	- 66
6.3 Receptory związane z kinazą tyrozynową	
6.3.1 Receptor insuliny – gen <i>INSR</i>	- 67
6.3.2 Receptor insulino-podobnego czynnika wzrostu 1 – gen <i>IGF1R</i>	

	- 68
6.4 Polimorfizmy w regionach UTR (<i>untranslated regions</i>)	- 70
6.5 Podsumowanie	- 73
7. WNIOSKI	- 74
8. STRESZCZENIE	- 75
9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (ABSTRACT)	- 77
10. PIŚMIENICTWO	- 78
11. SPIS TABEL	- 93
12. SPIS RYCIN	- 95
13. ZAŁĄCZNIKI	- 95

1. WYKAZ SKRÓTÓW

ACTH	hormon adrenokortykotropowy (<i>ang: adrenocorticotropin hormone</i>)
ADRB3	beta 3 adrenoreceptor (<i>ang: beta 3 adrenergic receptor</i>)
AgRP	białko z rodziny Aguti (<i>ang: Agouti- related protein</i>)
AHA	Amerykańskie Towarzystwo Kardiologiczne (<i>ang: American Heart Association</i>)
AR	receptor androgenów (<i>ang: androgen receptor</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. <i>body mass index</i>)
CI	przedział ufności (ang. <i>confidence interval</i>)
CRH	kortykoliberyna (<i>ang: corticotropin releasing hormone</i>)
DC	wariant powodujący chorobę (<i>ang. disease causing</i>)
del	delecja (<i>ang: deletion</i>)
DHEA-S	siarczan dehydroepiandrosteronu (<i>ang. dehydroepiandrosterone sulfate</i>)
DM	cukrzyca (ang. <i>diabetes mellitus</i>)
DRD4	receptor dopaminowy D4 (<i>ang: dopamine D4 receptor</i>)
ECLIA	elektrochemiluminescencja (ang: <i>electrochemiluminescence immunoassay</i>)
EDC	czynniki zmieniające działanie hormonów (ang. <i>endocrine disrupting chemicals</i>)
EHIS	Europejskie Ankietowe Badanie Stanu Zdrowia (ang <i>European Health Interview Survey</i>)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ESR	receptor estrogenowy (<i>ang. estrogen receptor</i>)
ExAC	populacyjna baza danych genetycznych (ang. <i>Exome Aggregation Consortium</i>)
FSH	hormon folikulotropowy (ang. <i>follicle-stimulating hormone</i>)
FTI	wskaźnik wolnego testosteronu (ang. <i>free testosterone index</i>)
FTO	gen związane z tkanką tłuszczową i otyłością (ang : <i>Fat-mass and obesity association gene</i>)
GH	hormon wzrostu (ang. <i>growth hormone</i>)

GnRH	gonadoliberyna (<i>ang: gonadotropin releasing hormone</i>)
GWAS	badanie asocjacyjne całego genomu (<i>ang: genome wide association studies</i>)
HDL	lipoproteiny wysokiej gęstości (<i>ang. high density lipoprotein</i>)
HGMD	baza mutacji ludzkiego genomu (<i>ang. Human Gene Mutation Database</i>)
HGVS	(<i>ang: Human Genome Variant Society</i>)
Hom	układ homozygotyczny (<i>ang: homozygote</i>)
HOMA-IR	wskaźnik insulinooporności (<i>ang. Homeostatic Model Assessment for insulin resistance index</i>)
IAS	<i>ang. International Atherosclerosis Society</i>
IASO	Międzynarodowe Stowarzyszenie Badań nad Otyłością (<i>ang. International Association for the Study of Obesity</i>)
IDF	Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna (<i>ang. International Diabetes Federation</i>)
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (<i>ang. insulin-like growth factor 1</i>)
IGF1R	receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (<i>ang: insulin-like growth factor 1 receptor</i>)
IFG	nieprawidłowa glikemia na czczo (<i>ang: impaired fasting glucose</i>)
IGT	upośledzona tolerancja glukozy (<i>ang : impaired glucose tolerance</i>)
INSR	receptor insuliny (<i>ang. insulin receptor</i>)
IR	insulinooporność (<i>ang. insulin resistance</i>)
LEPR	receptor leptyny (<i>ang leptin receptor</i>)
LDL	lipoproteiny niskiej gęstości (<i>ang. low density lipoprotein</i>)
LH	hormon luteinizujący (<i>ang: luteinizing hormone</i>)
LOVD	elektroniczna baza wariantów DNA (<i>ang: Leiden Open Variation Database</i>)
LPL	lipaza lipoproteinowa (<i>ang: lipoprotein lipase</i>)
MAF	częstość rzadkiego allelu (<i>ang. minor allele frequency</i>)
MC4R	receptor melanokortyny 4 (<i>ang: melanocortin receptor 4</i>)
MSH	melanokortyna (<i>ang: melanocyte-stimulating hormone</i>)
NATPOL	Ogólnopolskie Badanie Rozpowszechnienia Czynnika Chorób Układu Krążenia
NGS	sekwencjonowanie następnej generacji (<i>ang. Next Generation Sequencing</i>)
NHLBI	<i>ang. National Heart, Lung and Blood Institute</i>

NMD	degradacja nieprawidłowego mRNA zawierającego wczesny kodon stop (ang. <i>nonsense mediated decay</i>)
NPY	neuropeptyd Y (ang: <i>neuropeptide Y</i>)
NR3C2	receptor mineralokortykoidów (ang: <i>mineralocorticoid receptor</i>)
OMIM	katalog chorób genetycznych człowieka (ang. <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>)
OR	iloraz szans (ang. <i>odds ratio</i>)
p	wartość prawdopodobieństwa (ang: <i>p value</i>)
PAI-1	inhibitor aktywatora plazminogenu (ang. <i>plasminogen activator inhibitor 1</i>)
PC-1	prokonwertaza 1 (<i>ang. proconvertase 1</i>)
PCSK1	prohormonu konwertazy typu 1 (ang: <i>prohormone convertase subtilisin/kexin-type 1</i>)
PCOS	zespół wielotorbielowatości jajników (ang. <i>polycystic ovary syndrom</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
POL	polimorfizm (ang. <i>polymorphism</i>)
POL-A	polimorfizm automatyczny (ang: <i>polymorphism automatic</i>)
POMC	proopiomelanokortyna (ang. <i>proopimelanocortin</i>)
PPAR Y	receptory gamma aktywowane przez proliferatory peroksysomalne (ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
PROT F	zmiana funkcji białka (ang. <i>protein function</i>)
RIA	metoda radioimmunologiczna (ang. radioimmunoassay)
SBE	zmiana pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single base exchange</i>)
SHGB	białko wiążące hormony płciowe (an. <i>sex hormone-binding globulin</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczych nukleotydów (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SPL-PROT F	łączenie wywołujące zmianę w funkcji białka

(ang: *splicing event affecting protein function*)

TG	triglicerydy (<i>ang. triglycerides</i>)
TNFα	czynnik martwicy nowotworu (<i>ang. tumor necrosis factor α</i>)
TSH	hormon tyreotropowy (tyreotropina) (<i>ang. thyroid stimulation hormone</i>)
UCP-1	termogenina - białko rozprzegające (<i>ang. uncoupling protein-1</i>)
UTR	rejon niekodujący genu (<i>ang. untranslated region</i>)
VLDL	lipoproteiny o bardzo małej gęstości (<i>ang. very-low-density lipoprotein</i>)
WES	sekwencjonowanie całego eksomu (<i>ang. whole exome sequencing</i>)
WGS	sekwencjonowanie całego genomu (<i>ang. whole genome sequencing</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (<i>ang. World Health Organization</i>)
WHR	wskaźnik talia-biodra (<i>ang. waist to hip ratio</i>)
WHtR	wskaźnik talia-wzrost (<i>ang. waist to height ratio</i>)
WKT	wolne kwasy tłuszczowe (<i>ang. free fatty acids</i>)
WOBASZ	Wieloośrodkowe Badanie Stanu Zdrowia Ludności

2. WSTĘP

Otyłość jest obecnie powszechnie występującym schorzeniem przewlekłym, którego leczenie wymaga coraz większych nakładów finansowych (*Schwartz MW, 2017*). Od lat 80 ubiegłego wieku obserwuje się postępujący wzrost wartości BMI (ang. *Body Mass Index*) u dorosłych o ok. 0,4-0,5 w ciągu dekady (*Finucane, 2011*). Przyjmuje się, że obecnie w Stanach Zjednoczonych co trzecia osoba jest dotknięta skutkami otyłości i jest to również przyczyna 1/3 zgonów w tym kraju. W Europie szacuje się, że ok 10-15% przedwczesnych zgonów to efekt otyłości. Generalnie prowadzone na świecie badania epidemiologiczne wskazują, że 40% dorosłych ma nadwagę a 10-15% otyłość. Problem ten coraz częściej dotyka również dzieci (*Daniels SR, 2009*). Jest to bardzo istotne, ponieważ występowanie otyłości w młodym wieku to czynnik ryzyka tej choroby w wieku dorosłym i niewątpliwa przyczyna częstych komplikacji tej choroby (*Barczyk, 2017, Parsons TJ, 1999; Cole TJ, 2000; Morales Camacho WJ, 2019*).

W Polsce, według wyników Europejskiego Ankietowego Badania Zdrowia (EHIS) w 2014 r. osoby z nadwagą i osoby otyłe stanowiły odpowiednio 36,6% i 16,7% populacji osób w wieku 15 lat i więcej, czyli łącznie 53,3%. Wartości te były ewidentnie powyżej średniej dla 28 krajów Unii Europejskiej wynoszącej 34,8% osób z nadwagą oraz 15,4% otyłych. Wg ogólnopolskich badań przeprowadzonych w ramach programu NATPOL (2011) i WOBASZ II (2013-2014) u ok. 68% mężczyzn i 56% kobiet stwierdza się za wysoką masę ciała (*Zdrojewski T, 2015, Drygas W, 2015*)

2.1 Definicja otyłości

Otyłość jest definiowana jako choroba, której głównym objawem jest nadmiar tkanki tłuszczowej (>25% masy ciała kobiety i >15% masy ciała mężczyzny). Najczęściej używanym orientacyjnym wskaźnikiem określającym zawartość tkanki tłuszczowej u dorosłych jest wskaźnik BMI, ale nie uwzględnia on masy mięśniowej czy różnic etnicznych. Przyjęto, że w grupie dorosłych górna granica normy (wg WHO) to 18,5- 25 kg/m² a wartości powyżej 30 kg/m² są definiowane jako otyłość. Wskaźnik ten nie ma zastosowania w określaniu otyłości u dzieci, u których stosuje się siatki centylowe (*Chinn S, 2006; WHO, www.who.int/ 08.2019*)

Ocena wartości BMI pozwala wyróżnić 3 grupy otyłości: klasę 1 - BMI 30-34,99 kg/m², klasę 2 – BMI 35 a 39,99 kg/m² i klasę 3 powyżej 40 kg/m² (tzw. otyłość olbrzymia). Istnieje też podział otyłości ze względu na rozmieszczenie tkanki tłuszczowej: na otyłość brzuszną (trzewną/centralną/androidalną) - przy wskaźniku talia/biodra u mężczyzn >0,9 i u kobiet >0,85 lub >80 cm obwodu talii u Europejki i >94 cm obwodu talii u Europejczyków, oraz otyłość pośladkowo-udową (gynoidalną) z przewagą tłuszczu w pasie biodrowym i udach. Podział ten ułatwia prognozowanie ryzyka powstania powikłań zdrowotnych - wiąże się to z różnicami między aktywnością metaboliczną i hormonalną tkanki tłuszczowej w różnych rejonach ciała. Wyższa aktywność metaboliczna jest bardziej charakterystyczna dla otyłości brzusznej co jednocześnie sprzyja nasilaniu aktywacji przewlekłych procesów zapalnych prowadzących do insulinooporności, dyslipidemii, stanu prozakrzepowego i miażdżycy. W wyniku tych zmian dochodzi do wystąpienia komplikacji zdrowotnych takich jak: nadciśnienie tętnicze, zawały serca, udary mózgu, nowotworów (tj. raki jelita grubego, sutka) i cukrzyca typu 2 (ryzyko to jest nawet do 10x większe niż w populacji osób szczupłych). Otyłość pośladkowo-udowa jest bardziej kojarzona ze zmianami zwyrodnieniowymi w układzie kostno-stawowym i żylakami kończyn dolnych (*Carey DGP, 1996*). W ostatnich czasach wyróżniono też otyłość występującą z równomiernym rozmieszczeniem tkanki tłuszczowej (*Salans LB, 1973; Goossen GH, 2017*)

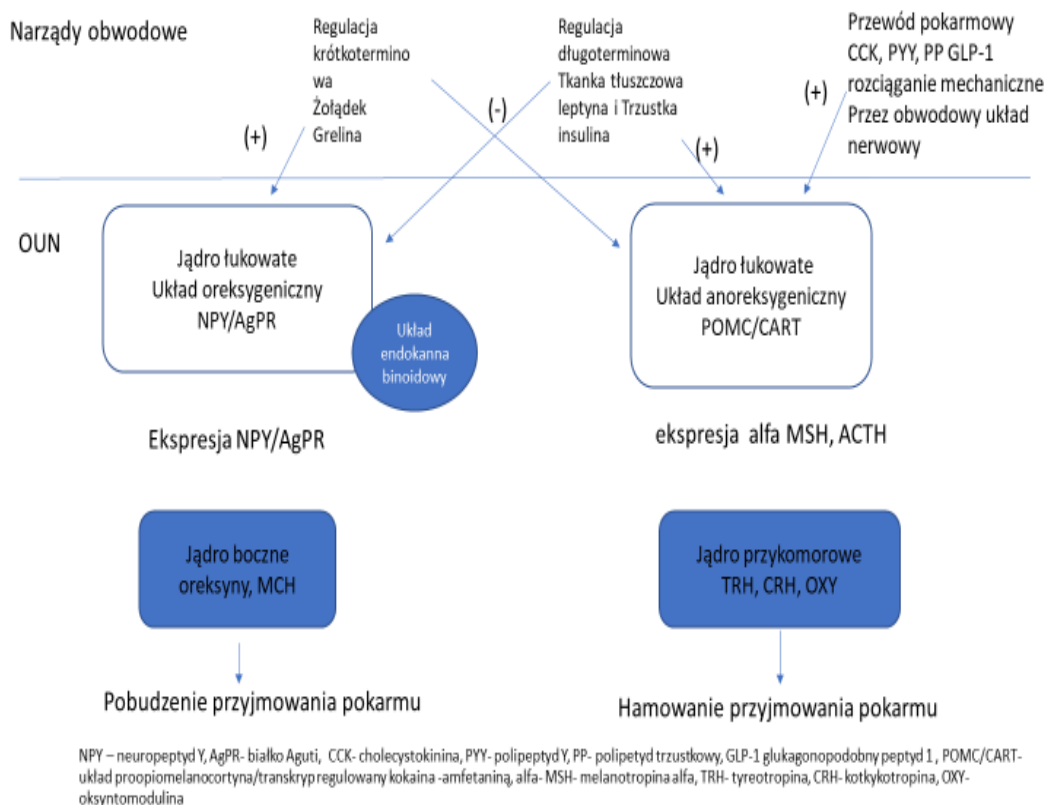
2.2 Patogeneza otyłości

Do otyłości bez względu na jej pierwotną przyczynę zawsze doprowadza dodatni bilans energetyczny, czyli nadmiar przyjętych z pokarmem kalorii w stosunku do wydatku energetycznego, którego wysokość jest zależna od podstawowego tempa metabolizmu (ilości energii potrzebnej do utrzymania podstawowych funkcji życiowych), procesów termoregulacji i aktywności fizycznej.

Etiologia otyłości jest złożona: zależy m.in. od współistnienia czynników genetycznych, czy też hormonalnych mających wpływ na przemianę i wydatkowanie energii. W przypadku otyłości prostej nadmiar dostarczonych kalorii jest wynikiem nieprawidłowych nawyków żywieniowych, przede wszystkim obecności w diecie wysoko przetworzonej i wysokokalorycznej żywności, ubogiej m.in. w witaminy i błonnik (*Malik VS, 2006, Drewnowski A, 2015*), zmniejszenia się aktywności fizycznej w wyniku postępu

technologicznego i siedzącego trybu życia (Brooks RC, 2010, Church TS, 2011), zaburzenia nastroju i snu (jedząc można częściowo zmniejszać objawy depresji, poprzez dostarczenie krótkotrwałej przyjemności) (Oliver G, 2000, Zellner DA, 2006, Yau YHC, 2013). Nie należy pomijać też czynników, które w ostatnim czasie zyskały status czynników ryzyka otyłości takich jak niedobór snu, czynniki zmieniające działanie układu endokrynnego - EDC (ang. *endocrine disrupting chemicals*), zmiany mikrobiomu (niektóre bakterie zmniejszają przewlekły odczyn zapalny występujący w otyłości i insulinooporności lub jak *Lactobacillus plantarum* produkujący kwas linolowy nasilają lipolizę, co dowiedziono w badaniach na myszach). Do innych czynników należą też zakażenia wirusowe: np. u zwierząt opisano sześć rodzajów wirusów mających związek z otyłością, dwa z nich występują także u ludzi (adenowirus ptasi SMAM-1 i adenowirus AD-36). Istnieje teza, że adenowirusy uszkadzają jądro brzuszno-przyśrodkowe i przykomorowe podwzgórza, prowokując zwiększony apetyt i jak w przypadku AD-36 nasilają proliferację adipocytów (Dhurandhar NV, 2015, Turnbaugh PJ, 2009, Rosenbaum M, 2015). Rycina nr 1 przedstawia schemat centralnych i obwodowych mechanizmów neurohormonalnych kontroli przyjmowania pokarmów.

Rycina nr 1: Schemat mechanizmów neurohormonalnych kontroli przyjmowania pokarmów.



Ważną rolę w rozwoju otyłości odgrywają też czynniki ewolucyjne. Ludzie ewolucyjnie mają zapisaną predyspozycję do gromadzenia energii w tkance tłuszczowej jako zapasu do wykorzystania w okresie deficytu pożywienia (ang. *factor of survival*). Wysznuło hipotezę oszczędnego genotypu – ewolucyjnego spadku po przodkach, u których okres obfitości pokarmu był momentem gromadzenia zapasów w tkance tłuszczowej co ułatwiało przeżycie w okresach głodu. Obecnie gdy czynniki klimatyczne i pogodowe mają na nas mniejszy wpływ (dostępność ogrzewania, klimatyzacja) i gdy teoretycznie mamy nieograniczony dostęp do pożywienia to zdolność do szybkiego gromadzenia tkanki tłuszczowej stała się biologiczną przyczyną pojawienia się wzrostu masy ciała i otyłości, ponieważ organizm nie potrafi przewidzieć zapotrzebowania na energię, jakie pojawi się w nadchodzącym czasie (*Speakman JR, 2007, Schwartz M, 2017*). Udowodniono też, że zaburzenia rozwoju płodu i czynności łożyska prowadzące do niedożywienia płodu i niskiej masy urodzeniowej oraz niedobory niektórych mikroelementów i kwasu foliowego w diecie matki (*Burdge GC, 2009*) prowadzą zgodnie z hipotezą oszczędnego genotypu do trwałej zmiany w ekspresji genów i przestrojenia szlaków metabolicznych zależnych od insuliny (*Borengasser SJ, 2013; Desaim, 2013*). Dodatkowo udowodniono w kilku badaniach, że cukrzyca występująca u matki w okresie ciąży jak i wysokie BMI matki przed ciążą są silnymi czynnikami ryzyka wczesnego pojawienia się otyłości u dziecka (*Sharp GC, 2015; Catalano PM, 2009; Dabelea D, 2000*).

W przypadku rzadziej występującej otyłości wtórnej jej przyczynami mogą być zaburzenia endokrynologiczne, choroby ośrodkowego układu nerwowego (np. mózgowo porażenie dziecięce, czaszkogardlak, zapalenia mózgu, działania jatrogenne (uszkodzenie podwzgórza przez zabieg neurochirurgiczny albo radioterapię) lub przewlekła farmakoterapia lekami o tzw. działaniu adipogennym (*Valdearcos M, 2014; Thaler JP, 2012*).

2.3 Otyłość jako konsekwencja zaburzeń hormonalnych

Otyłość może być wynikiem zaburzeń gospodarki hormonalnej ale w związku z rolą tkanki tłuszczowej w procesach regulacji odżywiania i jej możliwościami endokrynnymi zmiany hormonalne mogą być także skutkiem otyłości.

Sama tkanka tłuszczowa może być motorem otyłości. Hormony tkanki tłuszczowej mają szczególne znaczenie w kontekście patologii, w których osiowym zaburzeniem jest otyłość, takich jak zespół metaboliczny oraz cukrzyca typu 2. Tkanka tłuszczowa odgrywa istotną rolę w układzie dokrewnym nie tylko jako źródło hormonów, ale także jako miejsce ich metabolizmu, co głównie dotyczy steroidów. Warto podkreślić, że istnieje możliwość lokalnej transformacji steroidów do ich postaci o większej lub mniejszej aktywności, co dotyczy zarówno tak zwanych steroidów płciowych, jak i kortykosteroidów (*Wake DJ, 2007; Siemińska L, 2007*).

Różnice w rozmieszczeniu tkanki tłuszczowej u mężczyzn i kobiet sugerują duże znaczenie hormonów płciowych w tej dystrybucji. Widać to szczególnie u osób transseksualnych, które otrzymując hormony przeciwnej płci prezentują zmiany w dystrybucji tkanki tłuszczowej. Stwierdzono, że niskie stężenia wolnego testosteronu ale także i białka wiążącego hormony płciowe SHBG (ang. *Sex Hormone Binding Globulin*) korelują z obecnością otyłości trzewnej podobnie jak niskie stężenia dihydroepiandrosteronu DHEA (ang. *dehydroepiandrosterone*) i siarczanu dihydroepiandrosteronu DHEA-S (ang. *dehydroepiandrosterone sulphate*). Wyrównanie stężenia testosteronu w tych przypadkach zmniejsza ilość tłuszczu trzewnego. Inna sytuacja pojawia się np. u kobiet z zespołem policystycznych jajników (*PCOS, ang. polycystic ovary syndrome*), u których hiperandrogenizm prowadzi do rozwoju otyłości trzewnej i hiperinsulinemii choć nadal te kwestie są kontrowersyjne (*Tchernoff A, 2013; Shi H, 2007*).

W tabeli nr.1 przedstawiono zaburzenia hormonalne którym towarzyszy otyłość.

Tabela nr 1 Przyczyny hormonalne otyłości (Poddar M, 2017)

Zaburzenie endokrynne	Konsekwencje metaboliczne
Niedoczynność przysadki wielohormonalna lub izolowane niedobory GH, gonadotropin (konsekwencje niedoboru TSH podobne jak w pierwotnej niedoczynności tarczycy)	Przyrost tkanki tłuszczowej trzewnej – brak hamowania dojrzewania adipocytów, (GH) i stymulacja proliferacji preadipocytów (IGF-1), zanik beztłuszczowej masy ciała, hipoglikemia, hiperlipidemia (wyższe stężenia LDL i Tg, niskie HDL)- u dorosłych, niski wzrost u dzieci. Nasilenie insulinooporności zależne od nasilenia kumulacji tkanki tłuszczowej (2x większe ryzyko zespołu metabolicznego).
Hiperkortyzolemia (choroba Cushinga, nadnerczowy zespół Cushinga)	Zaburzenia gospodarki węglowodanowej poprzez nasilenie insulinooporności mięśni, w adipocytach i wątrobie (zmniejszenie wychwytu glukozy). Zmniejszenie syntezy glikogenu w mięśniach, zwiększenie glukoneogenezy Nasilenie lipolizy, uwalnianie glicerolu i WKT, nasilenie gromadzenie tłuszczu trzewnego, przyspieszenie dojrzewania adipocytów rozpad białek na obwodzie z nasileniem ich produkcji w wątrobie. Nasilenie wrażliwości komórek na działanie glukagonu, hormonu wzrostu, katecholamin
Niedoczynność tarczycy	Spowolnienie tempa metabolizmu, spowolnienie termogenezy, wzrost masy ciała, wzrost frakcji LDL cholesterolu i apolipoproteiny A.
Hiperinsulinizm	Oporność tkanek na działanie insuliny; nasilenie glukoneogenezy i glikogenolizy; Zwiększenie produkcji androgenów w jajnikach oraz ich dostępności przez zmniejszenie produkcji SHGB, zaburzenia osi podwzgórze przysadka gonady.
Hiperprolaktynemia	Wzrost masy ciała przez nadmierne spożycie pokarmu, obniżenie HDL z wzrostem stężenia LDL i triglicerydów, nasilenie hiperglikemii porannej, wpływ na proliferację komórek beta wysp trzustkowych. Nasilenie hipogonadyzmu
Pierwotna niewydolność gonad	<u>Niskie stężenie estrogenów</u> - hamowanie biosyntezy białek, tłuszczu, androidalnym typ gromadzenia tkanki tłuszczowej. Niski progesteron - spadek syntezy glukagonu. <u>Niskie stężenie androgenów</u> - zmniejszenie masy mięśniowej, cukrzyca niezależna od BMI, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, przedwczesna miażdżyca

Tkanka tłuszczowa pełni rolę regulatorową poprzez oddziaływanie adipocytów, makrofagów, komórek układu odpornościowego i białek strukturalnych. Wzrost rozmiaru adipocyta powoduje powstanie stanu zapalnego, produkcję cytokin i uwalnianie adipokin. Niektóre z nich przedstawiono w tabeli nr 2

Tabela nr 2 Adipokiny i ich funkcje (Jung UJ, 2014; Min-Kyung S, 2018)

Adipokina	Komórki produkujące adipokinę	Funkcje podstawowe	Inne funkcje
Leptyna (hormon sytości)	Adipocyty limfocyty, hepatocyty. Produkcja jest proporcjonalna do wielkości tkanki tłuszczowej Pojawia się oporność receptora na suprafizjologiczne dawki co zabezpiecza przed dalszym rozrostem adipocyta	Regulacja przyjmowania pokarmu- niedobór- hiperfagia (brak hamowania wydzielania neuropeptydu Y w podwzgórzu). Wzrost wydatkowania energii Wzrost lipolizy w tkance tłuszczowej, spadek lipogenezy i glukoneogenezy, Zwiększenie insulino-wrażliwości w wątrobie i tkance mięśniowej, zmniejszenie stężenia glukozy we krwi, regulacja funkcji kom beta trzustki	Działanie prozapalne, wzrost produkcji wolnych rodników, ale dwukierunkowo- proces zapalny powoduje wzrost stężenia. Zapobiega ektopowemu odkładaniu lipidów, Odgrywa również rolę w kontroli ciśnienia tętniczego, remodelingu kości, angiogenezie, hematopoezie a także syntezie i uwalnianiu innych hormonów (np. FSH, LH, GH, TSH, melanokortyny) Rola w nowotworzeniu.
Adiponektyna	Produkcja przez dojrzałe komórki tłuszczowe po aktywacji receptora jądrowego PPAR- γ	Niskie stężenia u otyłych zwiększa insulino-wrażliwość tkanek (mięśni i wątroby) , poprawa funkcji komórek β -trzustki,	działanie: wazoprotekcyjne (zmniejsza adhezję do komórek śródbłonna), przeciwmiażdżycowe (oksydacja WKT, redukcja Tg i VLDL), przeciwzapalne, antyangiogenne a nawet przeciwnowotworowe
Rezystyna	Polipeptyd produkowany przez adipocyty	Jej stężenie wzrasta w otyłości. Koreluje z insulinoopornością, aktywuje glukoneogenezę nasila glikogenolizę, utrzymuje stałą glikemię w trakcie głodu.	Stymuluje śródbłonki do gromadzenia lipidów. Ma działanie prozapalne.
Neuropeptyd Y	Polipeptyd produk. w jądrze łukowatym podwzgórza	Nasilanie apetytu. Stymulowanie proadipocytów do podziału i dojrzewania	Regulacja angiogenezy i wazokonstrykcji,
Wisfatyna	Produkcja w tkance tłuszczowej (trzewnej , podskórnej) i makrofagach	Wysokie stężenie u otyłych z cukrzycą typu 2, stymuluje dojrzewanie adipocytów, ma działanie insulinomimetyczne przez receptor insulinowy; marker otluszczenia trzewnego	Działanie prozapalne (stymulacja IL 1b,IL 6 TNF alfa (silnie), leukocyty, Wpływ na różnicowanie komórek beta trzustki

2.4 Czynniki genetyczne w rozwoju otyłości

W badaniach przeprowadzonych na bliźniakach i na dzieciach z adopcji zaobserwowano, że ok 25% do 50% czynników ryzyka otyłości jest uwarunkowane genetycznie (*O’Rahilly S, 2008*). Wykazano że dzieci adoptowane mają predyspozycję do wysokiej zawartości tkanki tłuszczowej takiej jak rodzice biologiczni. Tak samo badania w grupie bliźniąt jedno i dwujajowych wychowywanych wspólnie lub osobno pokazały, że dziedziczność BMI waha się na poziomie 40-70 % (*Silventoinen K, 2010; Haworth C, 2008; Schousboe KL, 2003*). Dodatkowo po zmapowaniu genomu człowieka w 2003 (Human Genome Project) i w badaniach asocjacyjnych (ang. GWAS - *Genome Wide Association Studies* – GWAS) poznano miejsca w genomie, które mogą mieć potencjalne znaczenie w rozwoju otyłości u człowieka (*Day FR, 2011; Spelioted EK, 2010; Locke AE, 2015*). Z tego powodu w obecnych czasach czynniki genetyczne stały się ważnym obiektem badań nad etiologią otyłości. Dotyczy to tendencji do kumulacji tkanki tłuszczowej jak i zaburzeń na poziomie kontroli procesów łaknienia. Opisano ponad 600 genów mogących mieć związek z otyłością (*Trandafir LM, 2016*)

Biorąc pod uwagę czynniki genetyczne wyróżniamy rzadko występującą otyłość jednogenową – uwarunkowaną mutacjami pojedynczych genów i charakteryzującą się występowaniem otyłości olbrzymiej już we wczesnym dzieciństwie. Defekty pojedynczych genów dotyczą głównie:

a) genu dla 4 receptora melanokortyny (*melanocortin 4th receptor gene, MC4R*), zlokalizowanego w regionie q21 chromosomu 8. Defekt tego genu może być dziedziczony autosomalnie dominująco. Zmiany w genie zaburzają regulację przyjmowania pokarmu na poziomie podwzgórza powodując wzrost masy ciała w młodym wieku w wyniku niekontrolowanego apetytu (*Valette M, 2013; Lubrano-Berthelie C, 2003*).

b) genu leptyny - zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 7 (q31.3). U homozygot rozwija się ciężką otyłość wkrótce po urodzeniu, z towarzyszącą hiperfagią, zaburzeniami zachowania, zaburzeniem odporności komórkowej (*Chesi A, 2015; Farooqi SI, 2012; Heymsfield SB, 2006*)

c) genu receptora leptyny - kodowanego przez gen Ob-R zlokalizowany na chromosomie 1 (1p31). U homozygot występuje otyłość znacznego stopnia i nadmierny apetyt jak w przypadku niedoboru leptyny, ale dodatkowo występują objawy niedoczynności przysadki (*Tartaglia LA, 1995; Barczyk A, 2017*).

d) mutacji genów kodujących kolejne białka szlaku melanokortynowego: brak proopiomelanokortyny (prekursora hormonów) jako wynik mutacji genu POMC, powoduje w wyniku zaburzeń regulacji szlaku sygnałowego wystąpienie hiperfagii i wczesnej otyłości. Dodatkowo nakładające się zaburzenia hormonalne takie jak hipogonadyzm hipogonadotropowy, somatotropinowa niedoczynność przysadki nasilają fenotyp otyłości. Obserwuje się też częste występowanie otyłości u bliskich krewnych homozygot mutacji POMC (*Farooqi IS, 2005; Dubern B, 2012; Krude, 1998*).

e) prokonwertazy 1 (PC1) Mutacje genu PCSK1 (genu prohormonu konwertazy1/3 - PC1/3) zmapowanego w regionie 5q15 zaburzają funkcję PC1/3 (prohormon konwertazy 1). Enzym odpowiada za aktywowanie prekursorów hormonów peptydowych np. proopiomelanokortyny, proinsuliny, proglukagonu i progreliny. U homozygot obserwuje się hiperfagię, prowadzącą do wczesnego rozwoju otyłości, hipoglikemię poposiłkową , biegunki (*Creemers JW, 2012*)

f) białek biorących udział w powstawaniu i funkcjonowaniu sieci neuronalnej podwzgórza np.: genu SIM1 (zlokalizowanego w regionie 6q16.3), zmieniającego aktywność w jądra przykomorowego podwzgórza. W wyniku translokacji między chromosomami 1p22.1 i 6q16.2 powstaje fenotyp zbliżony do zespołu Pradera-Williego (*Holder JL, 2000; Bonnefond A, 2013*)

Mimo, poznania podłoża otyłości monogenowej uważa się, że znacznie częstsza jest otyłość uwarunkowana wielogenowo. Mutacje mogą dotyczyć genów związanych z regulacją łaknienia, poziomu podstawowej przemiany materii, dojrzewaniem komórek tkanki tłuszczowej czy aktywnością enzymów odpowiedzialnych za gospodarkę tłuszczową i węglowodanową. Wśród genów mających znaczenie w wielogenowej patogenezie otyłości wymienia się:

- a) gen FTO (ang. *fat mass and obesity-associated gene*) – gen podatności na otyłość; u homozygot występują zaburzenia kontroli łaknienia i nadmierna insulinooporność, które mogą być modyfikowane przez aktywność fizyczną (Kim JY, 2016; Yeo GS, 2014). Gen ten koduje enzym biorący udział w naprawie DNA co wpływa na włączanie lub wyłączenie aktywności innych genów odpowiedzialnych za np. rozwój tkanki tłuszczowej lub aktywność mózgu (Claussnitzer M, 2015),
- b) gen receptora dopaminy D4 (DRD4) - gen odpowiadający za regulację układu nagrody w śródmózgowiu. Zaburzenia jego funkcji doprowadzają do nadmiernego przyjmowania pokarmu jako wynik dążenia do zaspokojenia potrzeb, co utrudnia stosowanie reżimu dietetycznego jako metody leczniczej (Roth CL, 2013),
- c) gen receptora aktywowanego proliferatorami peroksysomu Y2 (PPAR γ 2) mającego udział w adipogenezie i metabolizmie lipidów (Memisoglu A, 2003).

Wśród otyłości uwarunkowanych genetycznie wyróżnia się także otyłość syndromiczną. Otyłość ta współtowarzyszy innym objawom w zespołach genetycznie uwarunkowanych (m.in. niepełnosprawności intelektualnej, dysmorfii czy zaburzeniom narządowym). Do otyłości syndromicznych należą m.in.: zespoły dysmorficzne uwarunkowane monogenowo ze współistnieniem wad wrodzonych lub/i niepełnosprawnością intelektualną, zespoły aberracji chromosomowych, zespoły uwarunkowane mikrodelecjami i mikroduplikacjami. W wyniku zmian o charakterze mikrodelecji lub mikroduplikacji dochodzi do utraty funkcji lub nadmiernej ekspresji genów zlokalizowanych w obrębie zmienionego odcinka chromosomu. Fenotyp powodowany przez tego typu zmiany zależy od rodzaju zmiany jak i od którego z rodziców pochodzi, jak w chorobach imprintingowych (Barczyk A, 2017). W przypadku diagnostyki otyłości syndromicznej należy uwzględnić analizę rodowodu, określić czas pojawienia się otyłości, ocenić dysmorfie, przeprowadzić badania dodatkowe pod kątem chorób współtowarzyszących. W opublikowanych w 2017 wynikach metaanalizy GWAS z uwzględnieniem analizy BMI wytypowano gen *GPD1L* (3p22.3) jako istotnego kandydata w etiologii insulinooporności i otyłości (ekspresja genu wzrasta w trakcie utraty masy ciała przy stosowaniu diety niskokalorycznej) (He H, 2017).

3. CEL PRACY

Zaburzenia gospodarki hormonalnej są ściśle związane z otyłością. Stanowią zarówno jej przyczynę jak i związany ze złożonymi mechanizmami regulacyjnymi skutek. Obecne badania uzmysławiają nam, że otyłość to nałożenie bardzo wielu czynników : genetycznych , środowiskowych, osobniczych. Najmniej poznane są jak dotychczas zmiany genetyczne. W erze indywidualnego podejścia do leczenia i coraz lepszych możliwości badawczych niezbędnym staje się poznanie zmian na poziomie molekularnym. Do tej pory badania genetyczne w otyłości koncentrowały się przede wszystkim na ocenie mutacji i polimorfizmów genów samych hormonów mających znaczenie w powstaniu tej choroby, natomiast bardzo niewiele wiadomo na temat zmian genetycznych w genach kodujących receptory dla tych hormonów. Dotychczasowe publikowane doniesienia dotyczyły pojedynczych genów lub pojedynczych polimorfizmów głównie receptorów glikokortykosteroidów i receptora androgenowego natomiast wykorzystanie metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS) daje możliwość jednoczesnej oceny szerokiego panelu genów i zmian, a przy założeniu poligeniczności otyłości może ukierunkować dalszą diagnostykę.

Wobec powyższego, celem pracy były:

- Ocena występowania mutacji i polimorfizmów genów receptorów insuliny (*INSR*), melanokortyny (*MC4R*), insulinopodobnego czynnika wzrostu (*IGF1R*), mineralokortykoidów (*NR3C2*), androgenów (*AR*), estrogenów (*ESR1* i *ESR2*) i beta-3 adrenoreceptora (*ADRB3*) u kobiet z otyłością prostą i w grupie kontrolnej bez otyłości
- Korelacja wykazanych mutacji i polimorfizmów z występowaniem otyłości brzusznej, zaburzeniami gospodarki lipidowej i węglowodanowej oraz zespołem metabolicznym

4. MATERIAŁ I METODY

4.1 GRUPA BADANA I GRUPA KONTROLNA

Badania prowadzono w dwóch grupach kobiet w wieku od 25 do 45 lat.

Grupa badana

Grupa 96 kobiet z BMI > 30 kg/m² pozostających pod opieką Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz Poradni Endokrynologicznej Szpitala Klinicznego im. H Świącickiego w Poznaniu a także Poradni Endokrynologicznej w NZOZ EUROMED w Poznaniu. Dwie pacjentki z badanej grupy są siostrami. Ze względu na brak możliwości badania rodziców i rodzeństwa zrezygnowano z analizy uwarunkowań rodzinnych otyłości w tej pracy.

Czas pojawienie się otyłości

Nie uzyskano precyzyjnych danych co do czasu (wieku) pojawienie się otyłości. U większości pacjentek stopniowy wzrost masy ciała nastąpił po okresie dojrzewania (co najmniej 5 lat przed obecnym badaniem). W grupie tej 37 pacjentek ewidentne nasilenie otyłości wiąże z okresem ciąży.

Grupa kontrolna

Grupa 96 kobiet z BMI <25 kg/m² - wolontariuszki, pacjentki Poradni Endokrynologicznej, które w momencie rekrutowania do grupy nie zgłaszały dolegliwości, nie pobierały żadnych leków, nie miały dotąd żadnej przeszłości chorobowej, bez otyłości lub nadwagi w wywiadzie, nie stosowały obecnie ani w przeszłości restrykcyjnych diet.

Zgodę na prowadzenie badań wyraziła Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu – nr decyzji 338/1 (2014 r.) – załącznik nr 10.

Dane demograficzne i antropometryczne badanych kobiet przedstawia tabela nr 3

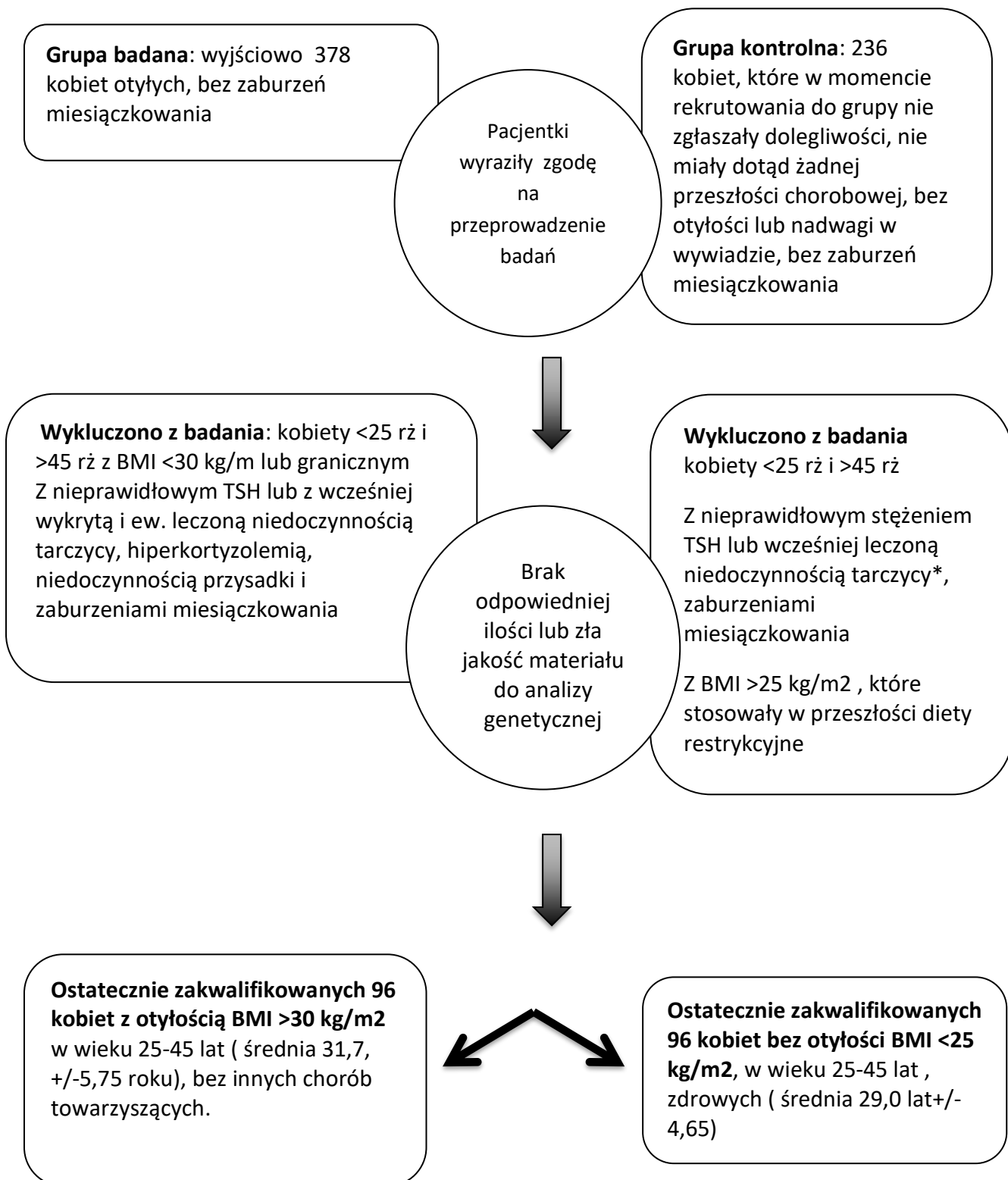
Tabela nr 3 : Dane demograficzne i antropometryczne analizowanych grup kobiet

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Wartość p
Wiek (lata)			
Zakres (min-max)	25-45	25-45	0,0030*
Średnia	31,7	29,0	
SD	5,75	4,65	
Mediana	31	29,0	
wzrost (cm)			
Zakres (min-max)	149-180	156-180	0,0075
Średnia	165,49	167,57	
SD	6,15	5,59	
Mediana	166	168	
masa ciała (kg)			
Zakres (min-max)	77-156	49-79	<0,00001
Średnia	105,24	58,30	
SD	19,8	5,19	
Mediana	102	58	
obwód pasa (cm)			
Zakres (min-max)	80-150	60-86	<0,00001
Średnia	109	70,92	
SD	13,8	5,83	
Mediana	107	70,5	
BMI (kg/m²)			
Zakres (min-max)	31-60,84	17,5-24,09	<0,00001
Średnia	38,24	20,83	
SD	5,96	1,67	
Mediana	36,9	20,67	

- mimo różnicy istotnej statystycznie dotyczącej wieku obu badanych grup (grupa kontrolna była nieco młodsza) zdecydowano się na analizę zebranych grup przy założeniu, że mediana wieku niewiele różni się pomiędzy grupami a zakres wiekowy jest ten sam przy czym otyłość w grupie badanej pojawiła się wiele lat przed tym badaniem.

Proces i kryteria kwalifikacji kobiet do badań przedstawia rycina nr. 2

Rycina nr 2. Etapy kwalifikacji do badań



- główną przyczyną pozostawania pod opieką poradni było monitorowanie wielkości wola guzkowego obojętnego

4.2 METODYKA BADAŃ KLINICZNYCH

Badanie podmiotowe

Podczas badania podmiotowego uwzględniano moment pojawienia się otyłości, wywiad osobniczy, rodzinny w kierunku zaburzeń odżywiania i otyłości, występowanie zaburzeń gospodarki lipidowej, węglowodanowej, współistniejących zaburzeń hormonalnych, i pobieranych leków.

Badanie przedmiotowe:

W trakcie badań wykonano pomiary antropometryczne: oceniano wzrost, masę ciała, obwodu pasa wykorzystując wagę lekarską, wzrostomierz oraz miarę krawiecką. Wykonano pomiar ciśnienie tętniczego krwi po ok 20 min spoczynku wykorzystując aparat elektroniczny pozostający na wyposażeniu oddziału.

Parametry wskaźnika masy ciała (ang. BMI - *Body Mass Index*) wyliczono użyciu wzoru:

$$\text{BMI} = \text{masa ciała w kg} / (\text{wzrost w metrach})^2$$

wskaźnik talia-wzrost (ang. WHtR - *waist to height ratio*) obliczano przy użyciu wzoru

$$\text{WHtR} = \text{obwód talii w cm} : \text{wzrost w cm}$$

Nie obliczano wskaźnika talia-biodra (ang. WHR *waist- hip ratio*) ze względu na brak oceny obwodu bioder u części pacjentek oraz iż uznano, że wskaźnik WHtR jest czułym narzędziem w ocenie otyłości centralnej i ryzyka pojawienia się powikłań kardiometabolicznych. Przyjmuje się, że ryzyko to jest zwiększone gdy wartość wskaźnika WHtR przekracza 0,5 (*Yoo EG, 2016; Browning LM, 2010*).

U każdej pacjentki z grupy badanej i grupy kontrolnej wykonano USG jamy brzusznej, USG tarczycy, oraz przeprowadzono konsultację ginekologiczną - celem wykluczenia nieprawidłowości

4.3 Metodyka badania biochemicznych i hormonalnych :

Badania biochemiczne krwi wykonano w Centralnym Laboratorium Analityczno-Biochemicznym Szpitala Klinicznego im. Heliodora Święcickiego w Poznaniu.

Oceniano następujące parametry biochemiczne:

a) kreatyninę, stężenia elektrolitów tj. sód, potas, aminotransferazę alaninową i asparginową w surowicy krwi - celem wykluczenia chorób nerek i wątroby;

b) stężenia glukozy i insuliny w dwupunktowym teście obciążenia glukozą - w 0 min i 120 min po podaniu doustnym 75 g glukozy u wszystkich pacjentek bez wywiadu w kierunku cukrzycy;

c) gospodarkę lipidową - oznaczano cholesterol całkowity, frakcje HDL, triglicerydy (TG) oraz wyliczano frakcję LDL;

W tabeli nr. 4 zamieszczono zakres norm i metody oznaczania ocenianych parametrów biochemicznych wybranych do korelacji genetyczno-klinicznych.

Tabela nr .4 : Zakresy norm i metody oznaczeń biochemicznych wykorzystanych do korelacji kliniczno-genetycznych

Badanie laboratoryjne	Zakres normy	Metoda oznaczenia
glukoza	70-90 mg/dl	metoda oksydazowa.
cholesterol całkowity	<200 mg/dl	metoda enzymatyczno-kolometryczna
HDL cholesterol	Kobiety >45 mg/dl	metoda enzymatyczno-kolometryczna
triglicerydy	65-150 mg/dl	metoda enzymatyczno-kolometryczna
LDL cholesterol (wyliczony)	<135 mg/dl	wyliczany ze wzoru

Badania hormonalne

Badania hormonalne: wykonywano w Centralnym Laboratorium Analityczno-Biochemicznym Szpitala Klinicznego im. Heliodora Świącickiego w Poznaniu wykorzystano do wykluczenia nakładania się zaburzeń hormonalnych i do celów konsultacji wykonywanej przez ginekologa-endokrynologa.

Wykaz i zakres norm badań hormonalnych umieszczono w tabeli nr 5

Tabela nr 5 : Zakres norm i metody oznaczeń hormonalnych (ECLIA – elektrochemiluminescencja; RIA – metoda radioimmunologiczna)

Hormon	Zakres norm	Metoda oznaczenia
Insulina (μU/ml)	3-17	ECLIA
TSH (mIU/l)	0,27-4,20	ECLIA
ft3 (pmol/l)	3,90-6,70	ECLIA
ft4 (pmol/l)	11,5-21,0	ECLIA
Kortyzol (nmol/l)	godz. 08.00: <i>do 2015r</i> : 171-536, <i>od 2016 r.</i> 172-497 godz. 16-18.00: <i>do 2015 r.</i> 64-327 <i>od 2016 r.</i> 74-286	ECLIA
ACTH (pg/ml)	7,20-63,30	ECLIA
FSH (mIU/ml)	Norma zależna od fazy cyklu: faza folikularna- 3,5-12,0 owulacyjna 4,7-21,5, lutealna 1,5-8,0, postmenopauzalna 26,0-135,0	ECLIA
LH (mIU/ml)	Norma zależna od fazy cyklu faza folikularna 2,5-12,5 owulacyjna 14,0-95,6, lutealna 1,0-11,5, postmenopauzalna 7,5-58,5	ECLIA
IGF-1 (ng/ml)	Norma zależna od wieku i płci kobiety 20-30 lat 161-517, 30-40 lat-153-489, 40-54 lat-90-360, >54 lata-71-290	RIA
Estradiol (pg/ml)	Norma zależna od fazy cyklu faza folikularna 12-233 , owulacyjna 41-398, lutealna 22-341	ECLIA
PRL (mIU/l)	70-510	ECLIA
DHEA-s (μg/dl)	61-337 do 2014, od 2015 99-340	ECLIA
Testosteron całkowity (nmol/l) i wskaźnik wolnego testosteronu (FTI) (%)	0,2-2,9 (wsk. wolnego testosteronu: 0,51-6,53)	ECLIA

Ocena insulinooporności

Oceny wskaźnika insulinooporności dokonano wg poniższego wzoru przyjmując wartość HOMA-IR > 2,5 dla rozpoznania insulinooporności:

$$\text{HOMA IR} = \text{glukoza (mg/dl)} \times \text{insulina (}\mu\text{IU/ml)} / 405$$

ANALIZA STATYSTYCZNA DANYCH KLINICZNYCH W GRUPIE BADANEJ I KONTROLNEJ

Analizę statystyczną porównującą parametry kliniczne w obu grupach poddanych badaniom wykonano przy użyciu testu t-Studenta. Normalność rozkładu badanych parametrów oceniono testem Shapiro-Wilka.

4.5 METODYKA BADAŃ GENETYCZNYCH:

Założenia badań

Badania genetyczne odbywały się w Pracowni Endokrynologii Molekularnej w Katedrze i Klinice Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Analizy molekularne były przeprowadzane z użyciem platformy sekwencyjnej następnej generacji (NGS; ang. *Next Generation Sequencing*) o średniej przepustowości na aparacie Ion Torrent Personal Genome Machine (Ion PGM)[™] (Thermo Fisher Scientific, Inc.) i obejmowały następujące etapy, opisane poniżej:

1. Izolacja DNA
2. Zaprojektowanie i synteza oligonukleotydów dla panelu genów do sekwencjonowania następnej generacji (NGS) wg protokołu Ion AmpliSeq; przygotowanie biblioteki genomowej (amplifikacja fragmentów DNA oraz ich wzbogacenie z zastosowaniem metody emulsyjnego PCR);
3. Sekwencjonowanie na platformie Ion Torrent PGM;
4. Analiza sekwencji. Walidacja wybranych mutacji za pomocą sekwencjonowania kapilarnego metodą Sanger .

1. Izolacja DNA

DNA genomowe wyizolowano z 10 ml krwi obwodowej pobranej do próbki z EDTA (stężenie końcowe 0.1%). Izolację DNA z krwinek białych krwi obwodowej prowadzono przy użyciu metody ekstrakcji z wykorzystaniem mieszaniny fenolowo-chloroformową.

Otrzymane DNA było przechowywane w temperaturze -20°C do czasu sekwencjonowania. Analizę ilościową i jakościową DNA prowadzono przy pomocy spektrofotometru Nanodrop.

2. Przygotowanie biblioteki genomowej i wzbogacenie DNA

Następnym etapem badań było wygenerowanie biblioteki genomowej badanych fragmentów DNA dla każdego pacjenta i ligacja z unikalnymi adapterami Ion Torrent (ang. *barcoding*). Tworzenie biblioteki i następcze wzbogacenie sparowanych próbek DNA zostało wykonane z użyciem systemu *Ion OneTouch* (Thermo Fisher Scientific, Inc.), zgodnie z protokołem producenta (Thermo Fisher, San Diego, USA). Wykorzystano około 40 ng genomowego DNA od każdego pacjenta oraz zestaw Ampliseq Library Preparation Kit 2.0 (Thermo Fisher, San Diego, USA).

Przygotowanie biblioteki genomowej obejmowało następujące etapy:

- multipleksową amplifikację metodą reakcji łańcuchowej polimerazy, PCR docelowych fragmentów genomowego DNA (aktywacja termiczna próbek w 99°C przez 2 minuty (tzw. hot-start), następnie 17 cykli PCR, wstępna denaturacja cieplna w 99°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów i wydłużanie w 60°C przez 4 minuty);

W kolejnych etapach wykonano:

- częściowe trawienie sekwencji starterowych celem przyłączenia znaczników;
- ligację adapterów Ion Torrent do aplikonów i oczyszczanie niezligowanej biblioteki;
- analizę ilościową bibliotek z użyciem Fluorymetru Qubit 2.0. (Cat. no Q32866) i zestawu Qubit dsDNA HS Assay Kit z wykorzystaniem 5 uL produktu PCR
- rozcieńczenie biblioteki z użyciem MilliQ superczystej wody celem uzyskania stężenia około 100 pM dla każdej próbki.
- ostateczne wzbogacenie biblioteki (klonalna amplifikacja z zastosowaniem emulsyjnego PCR (emPCR)); 25 ul każdej próbki zostało wzbogaconych z użyciem aparatu One-Touch Two (OT2) i zestawu wzbogacającego Ion PGM™ Template OT2 400 (Thermo Fisher) celem przygotowania do sekwencjonowania cząsteczek aktywnych posiadających sekwencje kodujące (ang. *Template-positive Ion Sphere Particles*, Thermo Fisher, USA)

Biblioteka po przygotowaniu była przechowywana w temperaturze -20°C. Produkty PCR poszczególnych pacjentów zostały oznaczone przy użyciu zestawu znaczników Ion Xpress Barcode Adapter 1–96 kit (tzw. *barcoding*).

3. Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

Przygotowana wg w/w procedur biblioteka została rozcieńczona do 100 pM. Do bezpośredniego sekwencjonowania zastosowano Ion PGM Sequencing 400 Kit i chip sekwencyjny: Ion 318 v2 co gwarantowało zakładane pokrycie >200x na całą bibliotekę genomową pacjenta. Średnie pokrycie w wykonanym eksperymencie wyniosło dla prób wyniosło 199.8x. Po wygenerowaniu wyników w sekwenatorze Ion PGM™ dane zostały automatycznie przesłane do serwera Torrent gdzie były następnie poddawane przetwarzaniu sygnału, filtracji i algorytmom bazowym- generując sekwencje DNA o wysokiej jakości (pliki SAM/BAM oraz następnie porównaniu z sekwencją referencyjną człowieka (hg19) został utworzony plik VCF zawierający listę wariantów genetycznych).

Sekwencjonowanie genów receptorów poszczególnych hormonów zostało opracowane przy użyciu algorytmu udostępnionego przez Thermo Fisher Scientific, pozwalającego na optymalne zaprojektowanie par starterów dla ampikonów długości do 400 pz (narzędzia dostępne poprzez stronę <http://www.ampliseq.com>). Pokrycie sekwencji badanych ampikonami w trakcie badań wyniosło 97-100%.

4. Analiza sekwencji i walidacja mutacji

Analizę otrzymanych sekwencji przeprowadzono za pomocą dedykowanych programów (np. IONReporter, Mutation Taster, PhenIX) oraz ogólnodostępnych narzędzi bioinformatycznych służących analizie porównawczej (Ensembl, NCBI). Odczytane sekwencje zostały zmapowane do genomu ludzkiego (GRCh37/hg19) z użyciem Torrent Suite™ software (version 4.0.2; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Do pozyskania informacji o znanych mutacjach wykorzystano ogólnodostępne bazy genetyczne np. GenBank, ClinVar, HGMD oraz baz genomowych (1000 genomes, 5000

exomes, ExAc). Programu PhenIX użyto za pośrednictwem strony internetowej <http://compbio.charite.de/PhenIX/> © 2014, Exomiser team: Charité Universitätsmedizin Berlin, Institute for Medical Genetics and Human Genetics. Otrzymane podczas badań genetycznych pliki VCF analizowano pod kątem zmian patogennych. Do programu wczytano uzyskane pliki VCF. Algorytm MutationTaster2 użyto za pośrednictwem strony <http://www.mutationtaster.org/StartQueryEngine.html>. Program MutationTaster wykorzystuje klasyfikator Bayesa celem oceny stopnia patogenności zmian genetycznych. Klasyfikacja ta opiera się między innymi na wykorzystaniu danych z dostępnych baz genetycznych (populacyjnych oraz mutacyjnych): HGMD, LOVD, ClinVar GnomeAD, ExAC oraz projektu 1000 Genomes. Zmiany genetyczne klasyfikowane są na podstawie braku zmiany sekwencji aminokwasowej (zmiany niesynonimiczne, synonimiczne i intronowe) bądź złożoności zmiany sekwencji aminokwasowej (zmiana pojedynczego aminokwasu bądź zmiana ramki odczytu sekwencji aminokwasowej). Wartość prawdopodobieństwa (p ; ang. *p value*) jest prawdopodobieństwem prognozy, tj. im p bliższe 1, tym wyższa pewność predykcyjna programu. Spośród najbardziej istotnych klinicznie wariantów określanych jako zmianę powodującą chorobę (ang. DC - *disease causing*) należy wymienić: zmianę powodującą przedwczesną terminację transkrypcji (kodon terminacyjny) i w następstwie wysokie prawdopodobieństwo rozpoznawanie i degradacji nieprawidłowego mRNA (ang. NMD - *nonsense mediated decay*), znacząca zmiana konformacji białka oraz mutacje typu "splice-site" wprowadzające nowe sygnały redagowania białka. Zmiana już opisana jako patogenna w bazach mutacyjnych ClinVar, HGMD, LOVD jest automatycznie określana jako zmiana powodująca chorobę (ang. DCA - *disease causing automatic*).

Po porównaniu każdy otrzymany wariant był raportowany zgodnie z nomenklaturą HGVS (*Human Genome Variant Society*), włączając informację o częstości populacyjnej w Europie wg. ExAC, statusu ClinVar oraz funkcji i konserwatywności ewolucyjnej. Główny katalog opisanych mutacji stanowiła baza danych HGMD.

Przy ocenie patogenności, uwzględniono następujące kryteria:

1. rodzaj mutacji, wpływ na konformację białka, konsekwencja zmiany struktury i funkcji odpowiedniego białka,
2. liczba mutacji allelicznych obserwowaną w kohorcie pacjentów o podobnym fenotypie,

3. ewolucyjna konserwatywność zmutowanego nukleotydu/aminokwasu,
4. lokalizacja mutacji w stosunku do funkcjonalnie ważnych domen białkowych.

Dane te następnie zostały skonfrontowane z danymi z dwóch wyżej opisanych programów analizujących mutacje (MutationTaster2 i PhenIX). W ocenie patogeniczności wariantu uwzględniono także częstość rzadkiego allelu MAF ang. *minor allele frequency* <1% w bazie ExAC (Exome Aggregation Consortium).

Warianty zidentyfikowane w badanych genach, zostały poddane automatycznej analizie *in silico* w celu oceny wpływu zmiany na architekturę białka, oceny jego funkcjonalności oraz potencjalnego zaangażowania w ekspresję nieprawidłowego fenotypu. Analiza *in silico* patogeniczności wykrytych wariantów została wykonana za pomocą algorytmów PolyPHEN, Sift, dbNSFP, CADD, Panther (sekwencje kodujące), SpliceSite, NNsplice, HumanSplicer (sekwencje intronowe).

Analiza statystyczna w badaniach genetycznych

Do analizy statystycznej wykorzystano warianty sekwencyjne badanych genów występujące z częstością poniżej 10% (MAF<0,1). Genotypy w grupie badanej porównano z częstościami genotypów w grupie kontrolnej (osoby bez klinicznych cech otyłości). W celu uzyskania istotności statystycznej zastosowano test Pearsona, Fishera oraz test χ^2 (Chi²). Dla każdego wariantu analizowano model dominujący jak i recesywny. Dla każdego wariantu analizowano iloraz szans (ang. *Odds Ratio* OR), 95 % przedział ufności (ang. *confidence interval* CI) oraz wartość p (ang. *p value*). Dowód istotności statystycznej stanowiła wartość p poniżej 0,05. Do analizy genetycznej uwzględniano taki iloraz szans OR dla których przedział ufności wynosił minimum 95%. Ponadto częstość alleli i genotypów sprawdzono pod kątem zgodności z teoretycznym rozkładem Hardy-Weinberga. Obliczenia wykonano za pomocą kalkulatora dostępnego na stronie <https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

Oceniane geny receptorów hormonów zamieszczono w tabeli nr 6

Tabela nr 6. Zestawienie analizowanych genów receptorów

Oznaczenie genu	Nazwa receptora	Lokalizacja cytogenetyczna genu	Wielkość genomowa	Sekwencja referencyjna
<i>ESR1</i>	Receptor estrogenów alfa	6q25.1-q25.2	618 Kpz*	NC_00006.12
<i>ESR2</i>	Receptor estrogenów beta	14q23.2-q23.3	146 Kpz	NC_000014.9
<i>AR</i>	Receptor androgenów	Xq12	243 Kpz	NC_000023.11
<i>NR3C2</i>	Receptor mineralokortykoidów	4q31	476 Kpz	NC_000004.12
<i>ADRB3</i>	Receptor beta 3 adrenergiczny	9p11.23	4,7 Kpz	NC_000008.11
<i>MC4R</i>	Receptor melanokortyny	18q21.32	2,2 Kpz	NC_000018.10
<i>INSR</i>	Receptor insuliny	19p13.2	237 Kpz	NC_000019.10
<i>IGF1R</i>	Receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1	15q26.3	411 Kpz	NC_000004.12

* kpz – kilo-par-zasad (tysiąc par zasad)

5. WYNIKI BADAŃ

5.1 Wyniki badań biochemicznych i hormonalnych

W obu grupach kobiet wykonano analizę wskaźników insulinooporności i ryzyka otyłości brzusznej (szczegółowe dane przedstawiono w tabeli nr 7. W grupie otyłych 66 kobiet miało wskaźnik HOMA-IR > 2,5 oraz 95 kobiet miało wskaźnik WHtR > 0,5.

Tabela nr 7 Wskaźniki HOMA-IR i WHtR w obu grupach kobiet

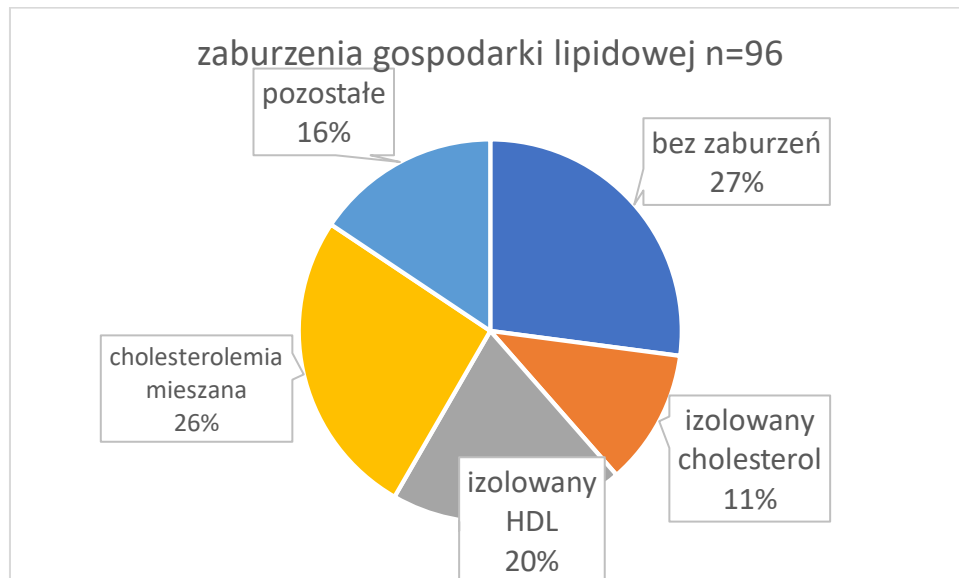
Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Wartość p
Wskaźnik HOMA-IR			
Zakres (min-max)	0,79-24,88	0,6-2,5	0,001081
Średnia	4,09	1,43	
SD	3,68	0,52	
Mediana	3,29	1,4	
Wskaźnik WHtR			
Zakres (min/max)	0,53-0,84	0,36-0,49	<0,00001
Średnia	65,69	0,42	
SD	7,88	0,053	
Mediana	64,49	0,42	

Zaburzenia gospodarki lipidowej

W grupie badanej podwyższone stężenie cholesterolu całkowitego (> 200 mg/dl – a wg Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego > 190!) występowało u 41 kobiet, w tym hiperlipidemię mieszaną stwierdzono u 25 kobiet z otyłością. U 1 kobiety z grupy kontrolnej stwierdzono hipercholesterolemię (216 mg/dl). Do analiz statystycznych przyjęto górną granicę normy cholesterolu całkowitego równą 200 mg/dl a nie 190 mg/dl. Zmiany wytycznych nastąpiły w 2016 roku, natomiast duża część danych i materiał biologiczny od pacjentek z grupy badanej była zabezpieczana od 2014 roku.

Na rycinie 3 przedstawiono występujące zaburzenia gospodarki lipidowej u kobiet otyłych.

Rycina nr 3 Zaburzenia gospodarki lipidowej w grupie kobiet z otyłością



Grupa „pozostałe” obejmuje połączenie wysokich triglicerydów z obniżonym HDL-cholesterolem lub hipercholesterolemię z obniżonym HDL-cholesterolem.

Wartości analizowanych parametrów gospodarki lipidowej w grupie badanej i kontrolnej przedstawiono w tabeli nr 8.

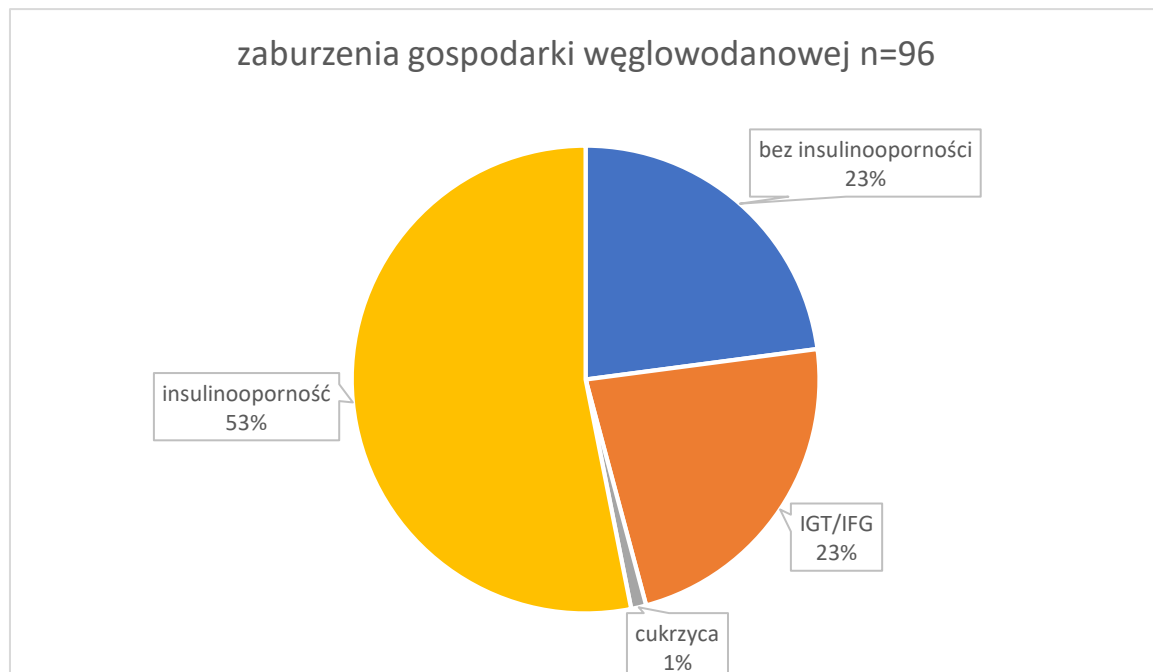
Tabela nr 8 Wartości badanych parametrów gospodarki lipidowej w obu grupach.

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Wartość p
Cholesterol całkowity (mg/dl)			
Zakres (min-max)	132-325	116-216	
Średnia	194,99	172,84	<0,00001
SD	35,82	24,64	
Mediana	194,5	175,5	
HDL cholesterol (mg/dl)			
Zakres (min-max)	21-82,3	36-102	
Średnia	49,23	71,96	<0,00001
SD	13,23	15,05	
Mediana	50,0	72,5	
LDL-cholesterol (mg/dl)			
Zakres (min/max)	58,2-465	48-138	
Średnia	117,93	87,79	0,0003
SD	45,21	21,04	
Mediana	112,8	85,25	
Triglicerydy (mg/dl)			
Zakres (min/max)	40-400	32-149	
Średnia	129,91	69,10	<0,00001
Odch. Standardowe	71,65	26,3	
Mediana	110,0	62,0	

Zaburzenia gospodarki węglowodanowej:

W grupie badanej u 74 kobiet stwierdzono insulinooporność na podstawie wartości wskaźnika HOMA-IR > 2,5. Zaburzenia gospodarki węglowodanowej o charakterze nieprawidłowej glikemii na czczo (IFG) lub nieprawidłowej tolerancji glukozy (IGT) stwierdzono u 22 pacjentek, cukrzyca występowała tylko u 1 osoby z grupy badanej. Zaburzenia te przedstawiono na rycinie nr 4 natomiast szczegółowe analizy gospodarki węglowodanowej przedstawiono w tabeli nr 9 i 10.

Rycina nr.4 Zaburzenia gospodarki węglowodanowej w grupie badanej



W tabeli nr.9 podano wartości minimalne i maksymalne, wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) i medianę glukozy na początku i w 120 min testu obciążenia 75 g glukozy (test OGTT) obu grupach i analogicznie wartości stężenia insuliny w teście OGTT w tabeli nr 10.

Tabela nr.9 Wartości stężenia glukozy w 0 i 120 min testu obciążenia 75 g glukozy poddane analizie w obu grupach.

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Wartość p
Glukoza (0min-mg/dl)			
Zakres (min-max)	71-173	60-99	0,1301
Średnia	93,3	86,13	
SD	13,64	6,16	
Mediana	90,5	86,0	
Glukoza (120 min- mg/dl)			
Zakres (min-max)	57-217	51-149	<0,00001
Średnia	119,82	92,75	
SD	29,4	20,86	
Mediana	118,5	88,5	

Tabela nr. 10 Wartości stężenia insuliny w 0 i 120 min testu obciążenia 75 g glukozy poddane analizie w obu grupach.

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Wartość p
Insulina (0min-μU/ml)			
Zakres (min-max)	3,86-56,85	3,15-17	0,0045
Średnia	17,75	6,88	
SD	14,35	2,51	
Mediana	14,35	6,82	
Insulina (120 min-μU/ml)			
Zakres (min-max)	5,96-225,7	11,6-96,33	<0,00001
Średnia	79,88	35,5	
SD	60,15	20,84	
Mediana	64,78	28,17	

Występowanie zespołu metabolicznego i chorób współistniejących .

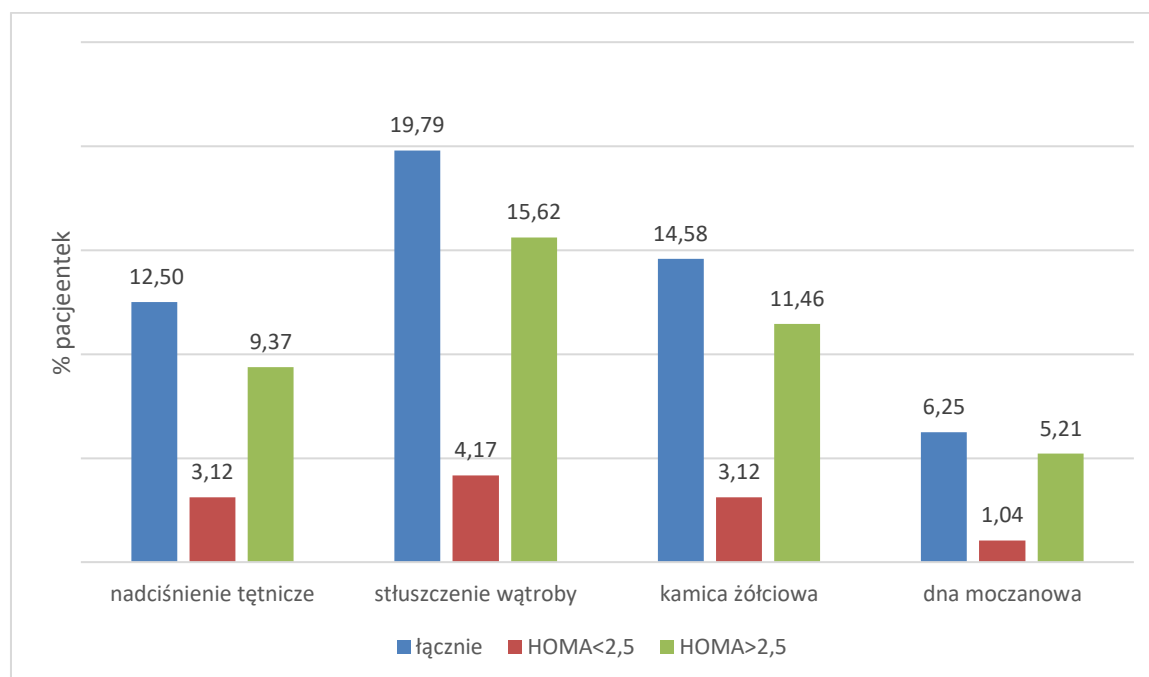
W oparciu o kryteria zawarte w tabeli nr 11 stwierdzono, że 43 kobiety z grupy badanej spełniały kryteria zespołu metabolicznego, natomiast pozostałe 53 kobiety nie.

Tabela nr 11 Kryteria rozpoznawania zespołu metabolicznego (2009) **wspólna definicja IDF, NHLBI, AHA, WHF, IAS i IASO (Alberti KG,2009)**

obecność 3 z 5 kryteriów :
obligacyjnym kryterium rozpoznania :podwyższony obwód bioder - specyficzny dla danej (w populacji europejskiej ≥ 80 cm u kobiet i ≥ 94 cm u mężczyzn)
Podwyższone stężenie trójglicerydów $>1,7$ nmol/l (150mg/dl) lub stosowanie leczenia
Podwyższone ciśnienie tętnicze krwi $>130/85$ mmHg lub stosowanie leczenia
Obniżone stężenie HDL-C $<1,0$ nmol/l (40 mg/dl) u mężczyzn i $<1,3$ nmol/l (50 mg/dl) u kobiet lub stosowanie leczenia.
Podwyższone stężenie glukozy na czczo $>5,6$ mmol/l (100 mg/dl) lub leczenie cukrzycy

Analizując m.in. występowanie nadciśnienia tętniczego jako składowej zespołu metabolicznego zwrócono uwagę na występowanie w grupie badanej chorób, których prawdopodobieństwo pojawienia się jest większe w grupie otyłej (Verkouter I ,2019; Ali S, 2018; LeeJH, 2019). Zestawienie zamieszczono na rycinie nr 5.

Rycina nr 5. Choroby występujące w grupie z otyłością



Analiza stężenia IGF-1 we krwi

Średnie stężenie IGF-1 we krwi u kobiet z otyłością wynosiło $208,4 \pm 99,7$ SD podczas gdy u kobiet z grupy kontrolnej wynosiło $285,6 \pm 102,3$ SD. Nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie pomiędzy obiema grupami.

5.2 Wyniki badań genetycznych

Wyniki przeprowadzonych badań genetycznych podzielono według rodzajów receptorów. Szczegółowej analizie podano tylko polimorfizmy, które w analizie statystycznej miały charakter sprzyjający lub ochronny wobec otyłości.

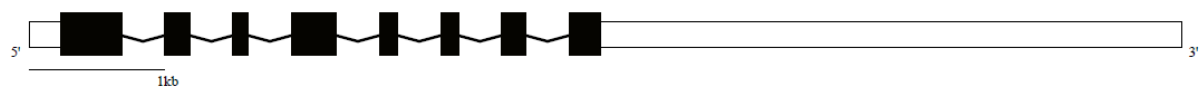
5.2.1 Receptory jądrowe

5.2.1.1 Geny receptorów estrogenów – geny *ESR1* i *ESR2*

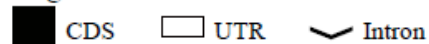
Gen *ESR1*

Analiza genu *ESR1* z wykorzystaniem metody NGS wykazała obecność 7 rzadkich polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w tym 4 do tej pory nie raportowanych. Szczegółowe dane dotyczące uzyskanych wyników badań genetycznych tego genu zawiera załącznik nr 1. Schemat genu został umieszczony na rycinie nr 6. Analiza wariantu istotnego statystycznie jest zawarta w tabeli nr 12. Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie genotyp.

Rycina nr 6 Schemat genu *ESR1*



Legend:



Źródło: GSDS *Gene Structure Display Server 2* <http://gsds.cbi.pku.edu.cn>

Tabela nr 12. Występowanie wykrytych polimorfizmów (SNP) genu *ESR1* u chorych z otyłością oraz w grupie kontrolnej - (A) – allele; (B i C) – genotypy (kalkulacja dla modelu odpowiednio: dominującego i recesywnego)

A.

Lp.	Polimorfizm	Grupa kontrolna (allele) (%)	Grupa z otyłością (allele)(%)	Allele		
				OR	CI	p
1	rs55716045	G=100 A=0	G=98 A=2	9,191	0,491-171,891	0,13725

B.

Lp.	Polimorfizm	Grupa kontrolna (genotypy) (%)	Grupa z otyłością (genotypy) (%)	Genotyp dominujący		
				OR	CI	p
1	rs55716045	GG=100 GA=0 AA=0	GG=96 GA=4 AA=0	9,389	0,499-176,830	0,04326

C. W przypadku genu *ESR1* nie stwierdzono obecności genotypu rzadkiego dla modelu recesywnego

Wykazano natomiast wyraźną zależność pomiędzy genotypem w modelu dominującym (obecność allelu G) a otyłością.

W tabeli nr.13 zawarto analizę korelacji klinicznych pomiędzy istotnym statystycznie dominującym polimorfizmem rs55716045 genu *ESR1* a poszczególnymi badanymi parametrami metabolicznymi. Poza otyłością, nie wykazano istotnych statystycznie korelacji z określonymi parametrami klinicznymi.

Tabela nr. 13 Korelacje kliniczne dla polimorfizmów genu *ESR1* (A,B,C)

A.

Gen	Polimorfizm	WHtR > 0,5		BMI 1 (30-34,99 kg/m ²)		BMI 2 (>35 kg/m ²)	
		OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p
<i>ESR1</i>	rs55716045	0,676	0,59784	0,178	0,10185	0,180	0,12173

B.

Gen	Polimorfizm	Hipercholesterolemia		Hiperlipidemia mieszana		Insulinooporność	
		OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p
<i>ESR1</i>	rs55716045	1,359	0,76329	3,000	0,26471	0,282	0,19350

C.

Gen	Polimorfizm	Zespół metaboliczny	
		OR [95% CI]	P
<i>ESR1</i>	rs55716045	1,359	0,76329

Gen *ESR2*

Analiza genu *ESR2* z wykorzystaniem metody NGS wykazała obecność 8 rzadkich polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w tym 3 do tej pory nie raportowanych. Szczegółowe dane dotyczące uzyskanych wyników badań genetycznych tego genu zawiera załącznik nr 2. Schemat genu został umieszczony na rycinie nr 7. Analiza wariantu istotnego statystycznie jest zawarta w tabeli nr 14.

Rycina nr 7. Schemat receptora *ESR-2*



Legend:

■ CDS □ UTR ~ Intron

Źródło: *GSDS Gene Structure Display Server 2* <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>

Tabela nr. 14: Występowanie wykrytych polimorfizmów genu *ESR2* u chorych z otyłością oraz w grupie kontrolnej - (A) – allele; (B i C) – genotypy (kalkulacja dla modelu odpowiednio: dominującego i recesywnego)

A.

Lp.	Polimorfizm	Grupa kontrolna (allele) (%)	Grupa z otyłością (allele)(%)	Allele		
				OR	CI	P
1	rs28440970	A=98, G=2	A=98, G=2	0,141	0,007-2,741	0,28537

B.

Lp.	Polimorfizm	Grupa kontrolna (genotypy) (%)	Grupa z otyłością (genotypy) (%)	Genotyp dominujący		
				OR	CI	p
1	rs28440970	AA=97, AG=3, GG=0	AA=97, AG=3, GG=0	0,138	0,007-2,716	0,08086

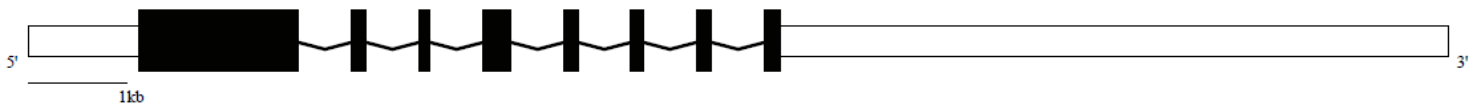
C. Nie wykazano obecności genotypu rzadkiego dla modelu recesywnego dla *ESR2*

Nie wykazano zależności między genotypem dominującym genu (obecność allelu G) a otyłością. Dla tego polimorfizmu nie dokonywano korelacji z obrazem klinicznym bo polimorfizm ten nie występował w grupie badanej. Jego obecność wykazano u 3 kobiet z grupy kontrolnej – co sugeruje jego działanie ochronne.

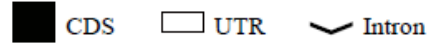
5.2.1.2 Gen receptora androgenów – *AR*

Analiza genu *AR* z wykorzystaniem metody NGS wykazała obecność 30 rzadkich polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w tym 23 do tej pory nie raportowanych. Szczegółowe dane dotyczące uzyskanych wyników badań genetycznych tego genu zawiera załącznik nr 3. Schemat genu został umieszczony na rycinie nr 8. Analiza wariantu istotnego statystycznie jest zawarta w tabeli nr 15.

Rycina nr 8: Schemat receptora AR



Legend:



Źródło: GSDS Gene Structure Display Server 2 <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>

Tabela nr 15. Występowanie wykrytych polimorfizmów genu *AR* u chorych z otyłością oraz w grupie kontrolnej - (A) – allele; (B i C) – genotypy (kalkulacja dla modelu odpowiednio: dominującego i recesywnego)

A.

Lp.	Polimorfizm	Grupa kontrolna (allele) (%)	Grupa z otyłością (allele) (%)	Allele		
				OR	CI	p
1	nowy (ochronny) chrX:66931222	A=93 G=7	A=98 G=2	0,271	0,087-0,837	0,01577
2	rs1282212474 (sprzyjający) chrX:66949830	A=100 An=0	A=96 An=4	17,737	1,016-309,502	0,00768
3	nowy (sprzyjający) chrX:66949841	T=98 A=2	T=92 A=8	5,339	1,520-18,755	0,00377

B.

Lp.	Polimorfizm	Grupa kontrolna (genotypy) (%)	Grupa z otyłością (genotypy) (%)	Genotyp dominujący		
				OR	CI	p
1	nowy (ochronny) chrX:66931222	AA=85 AG=14 GG=0	AA=96 AG=4 GG=0	0,255	0,081-0,805	0,01329
2	rs1282212474 (sprzyjający) chrX:66949830	AA=100 A/An=0 An/An=0	AA=92 A/An=8 An/An=0	18,537	1,054-325,861	0,00386
3	Nowy (sprzyjający) chrX:66949841	TT=97 TA=3 AA=0	TT=84 TA=15 AA=0	5,741	1,604-20,542	0,00297

C. Nie stwierdzono genotypów rzadkich dla modelu recesywnego, istotnych statystycznie w przypadku genu *AR*.

W tabeli nr 16 zawarto analizę korelacji klinicznych pomiędzy istotnymi statystycznie polimorfizmami dla genu *AR* a poszczególnymi badanymi parametrami metabolicznymi.

Stwierdzono że dwa z nich rs1282212474 (del/dupA) i nowy (chrX:66949841T>A) mają silną zależność z fenotypem w modelu dominującym. W przypadku nowego wariantu chrX:66931222G>A nie wykazano zależności z otyłością. Występuje on u 14 kobiet w grupie kontrolnej w stosunku do 4 otyłych co sugeruje jego działanie ochronne.

Tabela nr 16. Korelacje kliniczne dla polimorfizmów genu AR (A,B,C)

A.

Gen	Polimorfizm	WHtR > 0,5		BMI 1 (30-34,99 kg/m ²)		BMI 2 (>35 kg/m ²)	
		OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p
AR	nowy (ochronny) chrX:66931222	0,676	0,59784	1,759	0,62671	1,788	0,56543
AR	rs1282212474 (sprzyjający) chrX:66949830	0,422	0,44560	0,952	0,94902	0,556	0,48188
AR	nowy (sprzyjający) chrX:66949841	0,338	0,21727	1,705	0,39102	0,850	0,78427

B.

Gen	Polimorfizm	Hipercholesterolemia		Hiperlipidemia mieszana		Insulinooporność	
		OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p
AR	nowy (ochronny) chrX:66931222	1,359	0,76329	0,944	0,96132	0,900	0,92889
AR	rs1282212474 (sprzyjający) chrX:66949830	1,378	0,66322	0,381	0,36200	2,227	0,45522
AR	nowy (sprzyjający) chrX:66949841	0,625	0,42423	0,670	0,56161	4,983	0,09896

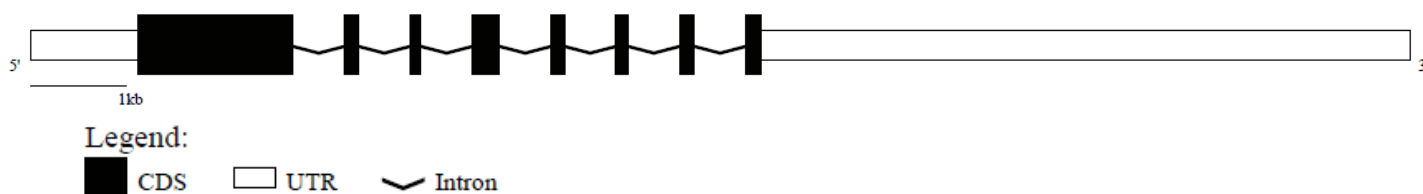
C.

Gen	Polimorfizm	Zespół metaboliczny	
		OR [95% CI]	p
AR	nowy (ochronny) chrX:66931222	1,30	0,87
AR	rs1282212474 (sprzyjający) chrX:66949830	0,399	0,36
AR	nowy (sprzyjający) chrX:66949841	0,595	0,37

5.2.1.3 Gen receptora mineralokortykoidów - *NR3C2*

Analiza genu *NR3C2* z wykorzystaniem metody NGS wykazała obecność 18 rzadkich polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w tym 10 do tej pory nie raportowanych. Szczegółowe dane dotyczące uzyskanych wyników badań genetycznych tego genu zawiera załącznik nr 4. Schemat genu został umieszczony na rycinie nr 9.

Rycina nr 9. Schemat genu receptora *NR3C2*



Źródło: GSDS *Gene Structure Display Server 2* <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>

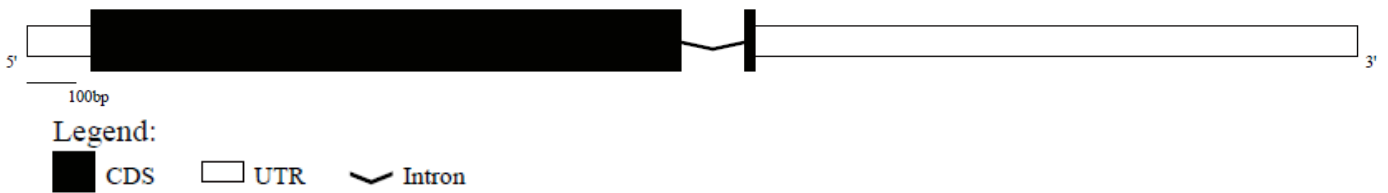
Nie stwierdzono występowania istotnych statystycznie wariantów genu *NR3C2* w grupie badanej ani grupie kontrolnej.

5.2.2 Geny receptorów związanych z białkiem G

5.2.2.1 Gen beta 3-adrenoreceptora - *ADRB3*

Analiza genu *ADRB3* z wykorzystaniem metody NGS wykazała obecność 13 rzadkich polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w tym 6 do tej pory nie raportowanych. Szczegółowe dane dotyczące uzyskanych wyników badań genetycznych tego genu zawiera załącznik nr 5. Schemat genu został umieszczony na rycinie nr 10. Analiza wariantu istotnego statystycznie jest zawarta w tabeli nr 17.

Rycina nr 10. Schemat receptora ADRB3



Źródło: GSDS Gene Structure Display Server 2 <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>

Tabela nr 17. Występowanie wykrytych polimorfizmów genu *ADRB3* u chorych z otyłością oraz w grupie kontrolnej - (A) – allele; (B i C) – genotypy (dla modelu odpowiednio: dominującego i recesywnego)

A.

Lp.	Polimorfizm	Grupa kontrolna (allele) (%)	Grupa z otyłością (allele)(%)	Allele		
				OR	CI	p
1	rs544651920, rs747043938 (multiple alleles) del(AC)3 / delACAC / delAC / dupAC / dupACAC / dup(AC)3	AC=91, del=9	AC=85, del=15	1,960	0,999-3,536	0,03349
2	rs3990401	AC=95, del=5	AC=98, del=2	0,280	0,076-0,034	0,04222

„multiple alleles” – allele wielokrotne – posiadają wiele form nukleotydowych dla danej pozycji genomowej

B.

Lp.	Polimorfizm	Grupa kontrolna (genotypy) (%)	Grupa z otyłością (genotypy) (%)	Genotyp dominujący		
				OR	CI	p
1	*rs544651920, rs747043938 (sprzyjający)	AC=81, AC/del()=19, del/del=0	AC=70, AC/del()=30, del/del=0	2,205	1,057-0,140	0,02123
2	rs3990401, (ochronny)	AC=89, AC/del()=11, del/del=0	AC=97 AC/del()=3 del/del=0	0,269	0,072-1,009	0,03871

* – dwa osobno skatalogowane warianty nukleotydowe dla danej pozycji genomowej.

C. Nie stwierdzono genotypów recesywnych istotnych statystycznie dla genu *ADRB3*

Dla polimorfizmu rs544651920 / rs747043938 wykazano zależność pomiędzy obecnością allelu rzadkiego i otyłością (model dominujący).

W tabeli nr 18 zawarto analizę korelacji klinicznych pomiędzy istotnym statystycznie dominującymi polimorfizmami rs5446510920/rs747043938, rs3990401 genu *ADRB3* a poszczególnymi badanymi parametrami metabolicznymi. Dla polimorfizmu rs3990401 istnieje wyraźny związek z otyłością brzuszną

Tabela nr 18: Korelacje kliniczne dla polimorfizmów genu *ADRB3* (A,B,C)

A.

Gen	Polimorfizm	WHtR > 0,5		BMI 1 (30-34,99 kg/m ²)		BMI 2 (>35 kg/m ²)	
		OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p	OR [95%CI]	p
ADRB3	rs544651920, rs747043938, (multiple alleles)	2,143	0,48660	0,681	0,40324	0,476	0,13445
ADRB3	rs3990401	0,114	0,04896	0,275	0,26939	0,868	0,90904

B.

Gen	Polimorfizm	Hipercholesterolemia		Hiperlipidemia mieszana		Insulinooporność	
		OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p
ADRB3	rs544651920, rs747043938, (multiple alleles)	1,009	0,98491	0,926	0,88137	0,865	0,78320
ADRB3	rs3990401,	2,769	0,39403	1,438	0,76999	0,592	0,67116

C.

Gen	Polimorfizm	Zespół metaboliczny	
		OR [95% CI]	p
ADRB3	rs544651920, rs747043938, multiple alleles	0,634	0,71
ADRB3	rs3990401	1,429	0,42

5.2.2.2 Gen receptora melanokortyny 4 – *MC4R*

Analiza genu *MC4R* z wykorzystaniem metody NGS wykazała obecność 5 rzadkich polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w tym 1 do tej pory nie raportowanego.

Szczegółowe dane dotyczące uzyskanych wyników badań genetycznych tego genu zawiera załącznik nr 6. Schemat genu został umieszczony na rycinie nr 11.

Żaden z wykrytych wariantów nie wykazywał istotności statystycznej dlatego nie wykonywano dalszej analizy dla genu *MC4R*.

Rycina nr 11. Schemat genu receptor *MC4R*



Źródło: GSDS *Gene Structure Display Server 2* <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>

5.2.3 Geny receptorów związanych z kinazami białkowymi:

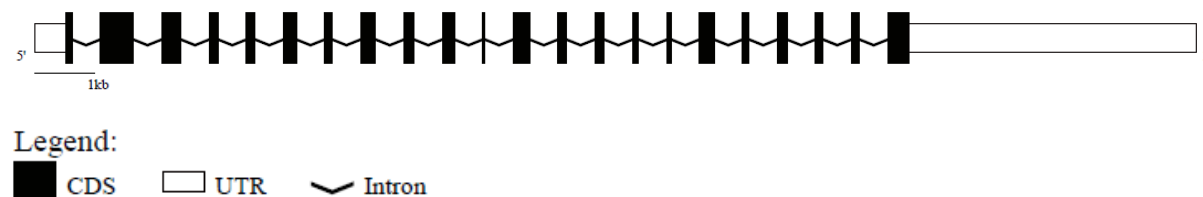
5.2.3.1 Gen receptora insuliny *INSR*.

Analiza genu *INSR* z wykorzystaniem metody NGS wykazała obecność 64 rzadkich polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w tym 30 do tej pory nie raportowanych.

Szczegółowe dane dotyczące uzyskanych wyników badań genetycznych tego genu zawiera załącznik nr 7. Schemat genu został umieszczony na rycinie nr 12.

Analiza wariantu istotnego statystycznie jest zawarta w tabeli nr 19.

Rycina nr 12: Schemat genu receptora *INSR*



Źródło: GSDS *Gene Structure Display Server 2* <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>

Tabela nr 19: Występowanie wykrytych polimorfizmów genu *INSR* u chorych z otyłością oraz w grupie kontrolnej - (A) – allele; (B i C) – genotypy (dla modelu odpowiednio: dominującego i recesywnego)

A.

Lp.	Polimorfizm	Grupa kontrolna (allele)(%)	Grupa z otyłością (allele)(%)	Allele		
				OR	CI	p
1	rs72988602 (ochronny)	T=94, C=6	T=98, C=2	0,261	0,072-0,951	0,02939
2	rs1220091470 (sprzyjający)	T=99, C=1	T=84, C=16	38,600	5,217-285,604	1,393e-08
3	rs148813626 (sprzyjający)	C=100, T=0	C=97, T=3	11,293	0,620-205,665	0,06655

B.

Lp.	Polimorfizm	Grupa kontrolna (genotypy) (%)	Grupa z otyłością (genotypy) (%)	Genotyp dominujący		
				OR	CI	p
1	rs72988602	TT=88, TC=12, CC=0	TT=96, TC=4, CC=0	0,249	0,067-0,924	0,02638
2	rs1220091470	TT=99, TC=1, CC=0	TT=66, TC=34, CC=0	48,000	6,397-360,153	2,528e-09
3	rs148813626	CC=100, CT=0, TT=0	CC=95, CT=5, TT=0	11,601	0,633-212,778	0,02347

C. Nie stwierdzono występowania genotypów recesywnych istotnych statystycznie.

Analiza haplotypów genu *INSR*

Analizę wykonano za pomocą programu Haploview 4.2. W badaniu zidentyfikowano 3 odrębne bloki haplotypów dla *INSR* : blok 1 który obejmuje warianty począwszy od intronu 2 aż do intronu 20, oraz bloki 2 i 3 znajdujące się w 3'UTR. Analizę wykonano za pomocą algorytmu *SolidSpine of LD*. Ponadto wykryto niezrównoważenie sprzężeń pomiędzy znanym

wariantem w intronie 17 (rs148813626) i nowo zidentyfikowanym markerem leżącym w pozycji Chr19:7116570, co może sugerować istotny wpływ na fenotyp. Podobnie jak w przypadku dalej omawianego genu *IGF1R* dwa nowe warianty wykryto w pozycjach rzadkich polimorfizmów, obydwa w grupie badanej i tylko jeden z nich wykryty był również w grupie kontrolnej (jedna osoba). Dla jednego wariantu wykryto odstępstwo od równowagi Hardy-Weinberga (duża liczba homozygot) co sugeruje konieczność analizy na większej grupie badanej lub włączenie do analizy małych rodzin (tzw. „trios”).

Schemat bloków do analizy haplotypów genu *INSR* przedstawiono na rycinie nr 13 zamieszczonej poniżej. Częstość występowania haloptypów przedstawiono w tabeli nr 20 oraz analizę istotności statystycznej w tabeli nr 21.

Rycina nr 13 : Analizowane haplotypy genu *INSR*

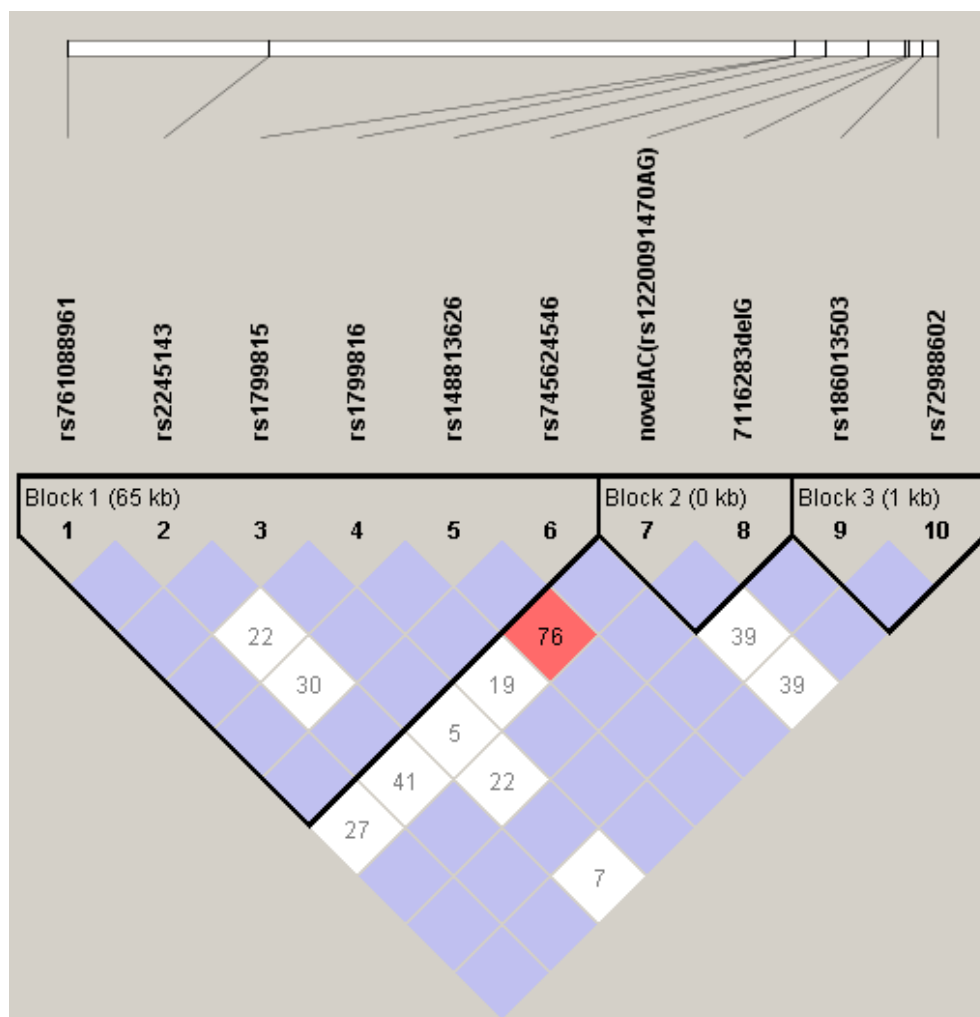


Tabela nr 20: Częstość występowania analizowanych haplotypów dla genu *INSR*

Haplotyp	Częstość ogólna	Częstość grupa badana	Częstość grupa kontrolna	Test Chi ²	Wartość p
Blok 1					
ACGCGG	0,866	0,857	0,875	0,262	0,609
ATGCGG	0,066	0,044	0,089	3,107	0,078
ACACGG	0,036	0,036	0,036	0,0	1,0
Blok 2					
AG	0,904	0,812	0,995	36,638	1,4221E-9
CG	0,086	0,167	0,005	31,859	1,6577E-8
AA	0,010	0,021	0,000	4,042	0,0444
Blok 3					
CA	0,958	0,974	0,943	2,348	0,1255
CG	0,036	0,016	0,057	4,744	0,0294

Tabela nr 21: Analiza istotności statystycznej haplotypów dla genu *INSR*

LP	Nazwa wariantu	Pozycja genom. Hg19	Częstość grupa badana	Częstość grupa kontrolna	Test Chi ²	Wartość p	Hardy - Weinberg wartość p
1	rs761088961	Chr19:7184675 Intron 2/21	0,016	0,000	3,024	0,0821	0,0157
2	rs2245143	Chr19:7168213 Intron 6/21	0,943	0,911	1,387	0,2389	0,692
3	rs1799815	Chr19:7125519 Exon 17/22	0,036	0,036	0,0	1,0	1,0
4	rs1799816	Chr19:7125518 Exon 17/22	0,016	0,000	3,024	0,0821	1,0
5	rs148813626	Chr19:7123031 Intron 17/21	0,026	0,000	5,066	0,0244	1,0
6	rs745624546	Chr19:7119600 Intron 20/21	0,005	0,000	1,003	0,3167	1,0
7	nowy A>C (rs1220091470 A>G)	Chr19:7116570 3'UTR	0,167	0,005	31,859	1,6577E-8	0,4444
8	nowy delG (rs1051651 G>C)	Chr19:7116283 3'UTR	0,021	0,000	4,042	0,0444	4,1118E-5
9	rs186013503	Chr19:7115150 3'UTR	0,010	0,000	2,01	0,1562	1,0
10	rs72988602	Chr19:7114038 3'UTR	0,984	0,943	4,744	0,0294	1,0

Dla polimorfizmów rs1220091470 i rs148813626 wykazano wyraźną zależność między obecnością allelu rzadkiego (kolejno T i C) a otyłością. W tabeli nr 22 zawarto analizę korelacji klinicznych pomiędzy istotnym statystycznie dominującymi polimorfizmami genu *INSR* a poszczególnymi badanymi parametrami metabolicznymi.

Dla polimorfizmu rs72988602 wykazano zależność obecności genotypu rzadkiego z zespołem metabolicznym. Dla nowego polimorfizmu w pozycji rs1051651 (raportowany G>C, w badaniu delG) uzyskano istotność statystyczną wobec niezachowania równowagi HWE i oczekiwanego rozkładu genotypów (2 homozygoty wobec braku heterozygot)

Tabela nr 22: Korelacje kliniczne dla polimorfizmów genu *INSR* (A,B,C)

A.

Gen	Polimorfizm	WtHR > 0,5		BMI 1 (30-34,99 kg/m ²)		BMI 2 (>35 kg/m ²)	
		OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p
<i>INSR</i>	rs72988602	0,520	0,64956	1,153	0,90904	3,636	0,26939
<i>INSR</i>	rs1220091470	2,627	0,37109	0,935	0,88081	0,873	0,76427
<i>INSR</i>	rs148813626	0,836	0,55318	0,853	0,86580	0,419	0,43225

B.

Gen	Polimorfizm	Hipercholesterolemia		Hiperlipidemia mieszana		Insulinooporność	
		OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p
<i>INSR</i>	rs72988602	2,769	0,39403	6,087	0,10331	2,234	0,33393
<i>INSR</i>	rs1220091470	0,880	0,77044	0,716	0,51068	0,857	0,76163
<i>INSR</i>	rs148813626	5,838	0,08337	4,705	0,07555	1,217	0,86345

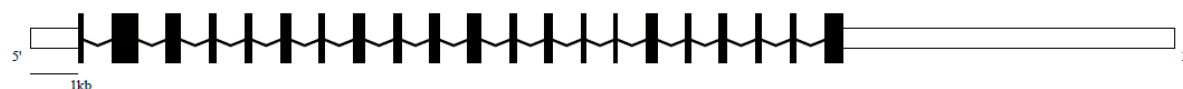
C.

Gen	Polimorfizm	Zespół metaboliczny	
		OR [95% CI]	p
<i>INSR</i>	rs72988602	9,658	0,04
<i>INSR</i>	rs1220091470	1,00	0,10
<i>INSR</i>	rs148813626	2,00	0,45

5.2.3.2 Gen receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu - *IGF1R*

Analiza genu *IGF1R* z wykorzystaniem metody NGS wykazała obecność 115 rzadkich polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w tym 53 do tej pory nie raportowanych. Szczegółowe dane dotyczące uzyskanych wyników badań genetycznych tego genu zawiera załącznik nr 8. Schemat genu został umieszczony na rycinie nr 14. Analiza wariantów istotnych statystycznie została zawarta w tabeli nr 23.

Rycina nr 14: Schemat genu receptora *IGF1R*



Legend:

CDS
 UTR
 Intron

Źródło: GSDS Gene Structure Display Server 2 <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>

Tabela nr. 23: Występowanie wykrytych polimorfizmów genu *IGF1R* u chorych z otyłością oraz w grupie kontrolnej - (A) – allele; (B i C) – genotypy (odpowiednio dla modelu: dominujący i recesywny)

A.

Lp.	Polimorfizm	Grupa kontrolna (allele) (%)	Grupa z otyłością (allele) (%)	Allele		
				OR	CI	p
1	rs768733704	T=100 C=0	T=93 C=7	28,955	1,709- 490,657	0,00024
2	rs45506098	C=100 T=0	C=97 T=3	11,293	0,620- 205,665	0,06655
3	rs745660795	T=100 delT=0	T=98 delT=2	9,191	0.491- 171.891	0,13725
4	Nowy (del TAAA, w regionie rs1434149464 i rs398028512) Chr15: 99503083	TAAA/TAAA=100 delTAAA=0	TAAA/TAAA=87 delTAAA=13	58,612	3,541- 970,140	2,326e-07
5	rs397836919	T=74 Tn=26	T=93 Tn=7	0,265	0,140-0,502	0,00002
6	*nowy Chr15: 99506402	C=100 delC=0	C=95 delC=5	19,932	1,152- 344,921	0,00373
7	rs76133807	C=100 delC=0	C=90, delC=10	48,265	2,902- 802,802	2,438e-06
8	**nowy Chr15: 99506415	G=100 C=0	G=87 C=13	61,276	3,706- 1013,23	1,285e-07
9	rs78894779	T=100, C=0	T=98, C=2	9,191	0.491- 171.891	0,13725

* dla tej pozycji zaraportowano rs76133807 C>T (NG009492.1: g.318651C>T), w obecnym badaniu zaobserwowano delecję C (delC).

** dla tej pozycji zaraportowano rs1434439068 G>T, w obecnym badaniu zaobserwowano substytucję G>C.

Cd . tabeli nr 23

B.

Lp.	Polimorfizm	Grupa kontrolna (genotypy) (%)	Grupa z otyłością (genotypy)(%)	Genotyp dominujący		
				OR	CI	p
1	rs768733704	TT=100 TC=0 CC=0	TT=86 TC=14 CC=0	31,204	1,827- 532,916	0,00019
2	rs45506098	CC=100 CT=0 TT=0	CC=95 CT=5 TT=0	11,601	0,633- 212,77	0,02347
3	rs745660795	TT=100 T/delT=0 delT/delT=0	TT=96 T/delT=4 delT/delT=0	9,389	0,499- 176,830	0,04326
4	nowy, del TAAA, Chr15: 99503083	TAAA/TAAA=100 TAAA/delTAAA=0 delTAAA/delTAAA= =0	TAAA/TAAA=74 TAAA/delTAAA=26 delTAAA/delTAAA= 0	68,832	4,121- 1149,61 4	8,267e- 08
5	rs397836919	TT=57 T/Tn=40 Tn/Tn=3	TT=86 T/Tn=13 Tn/Tn=1	0,210	0,103- 0,428	6,976e- 06
6	*nowy Chr15: 99506402	CC=100 C/delC=0 delC/delC=0	CC=91 C/delC=9 delC/delC=0	20,954	1,202- 365,343	0,00212
7	rs76133807,	CC=100 C/delC=0 delC/delC=0	CC=78 C/delC=22 delC/delC=0	54,960	3,276- 922,040	p=1,199e -06
8	**nowy Chr15: 99506415	GG=100 GC=0 GG=0	GG=73 GC=27 GG=0	72,546	4,347- 1210,58 4	4,162e- 08
9	rs78894779,	TT=100 TC=0 CC=0	TT=96 TC=4 CC=0	9,389	0,499- 176,830	0,04326

* i ** jak w poprzedniej tabeli

C. Nie stwierdzono obecności genotypów recesywnych

Dla większości polimorfizmów poza rs397836919 wykazano silną zależność pomiędzy obecnością alleli rzadkich w genotypie i otyłością.

Analiza haplotypów genu *IGF1R*

Analizę wykonano za pomocą programu Haploview 4.2. W badaniu zidentyfikowano 3 odrębne bloki haplotypów dla *IGF1R*: blok 1 który obejmuje region 5'UTR oraz warianty w eksonie 9 i intronie 19, oraz bloki 2 i 3 znajdujące się w 3'UTR. Analizę wykonano za pomocą algorytmu SolidSpine of LD.

Ponadto wykryto niezrównoważenie w regionie 3'UTR pomiędzy nowo zidentyfikowanymi markerami leżącymi blisko siebie w pozycjach 99506411 i 99506415, co może sugerować niebagatelny wpływ na fenotyp. Należy również zaznaczyć, że nowe warianty wykryto w pozycjach rzadkich polimorfizmów, natomiast nigdy nie raportowano wariantów wykrytych w grupie badanej. Co więcej, nowe warianty nie wystąpiły w grupie kontrolnej. Dla dwóch markerów wykryto odstępstwo od równowagi Hardy-Weinberga (duża liczba homozygot) co sugeruje konieczność analizy na większej grupie badanej lub włączenie do analizy małych rodzin (tzw. „trios”).

Schemat bloków do analizy haplotypów umieszczono na rycinie nr. 15, a wykaz analizowanych haplotypów w tabeli nr 24. Analizę istotności statystycznej umieszczono w tabeli nr 25

Rycina nr 15: Analiza haplotypów genu *IGF1R*

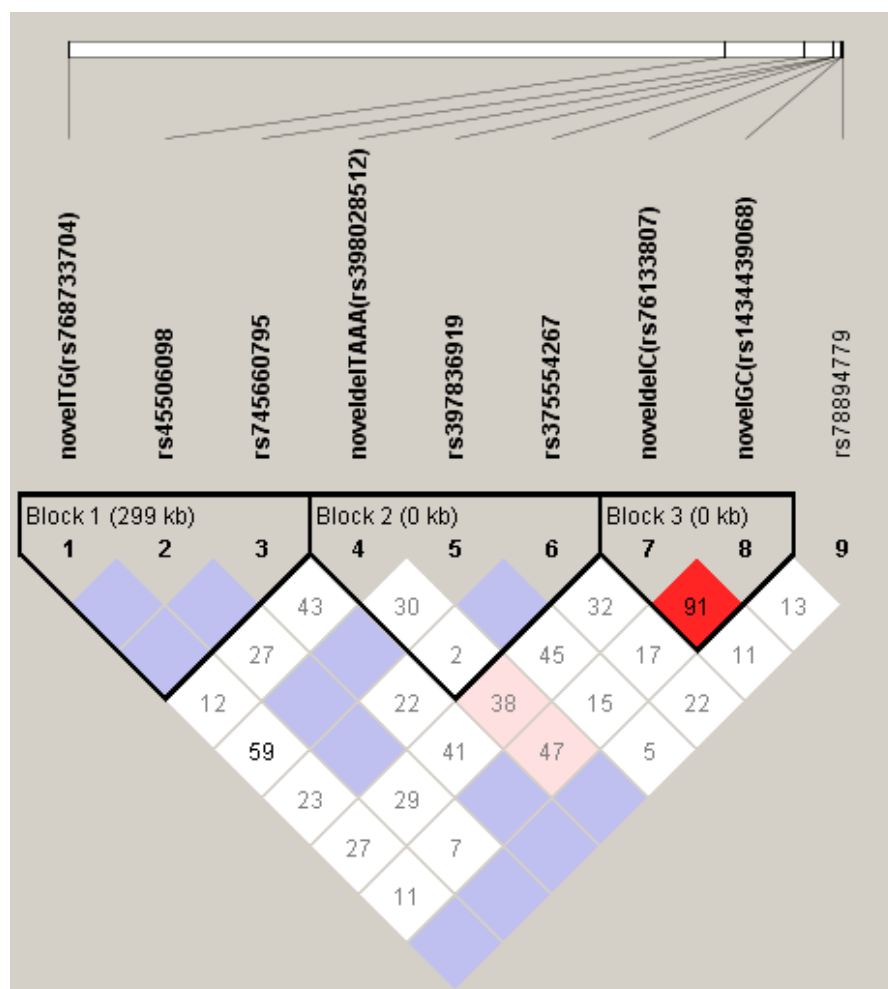


Tabela nr. 24. Częstość występowania haplotypów genu *IGF1R*

Haploty p	Częstość ogólna	Częstość grupa badana	Częstość grupa kontrolna	Test Chi ²	Wartość p
Blok 1					
GCT	0,943	0,885	1,000	23,337	1,3596E-6
TCT	0,034	0,068	0,000	13,456	2,0E-4
GTT	0,013	0,026	0,000	5,066	0,0244
GCA	0,010	0,021	0,000	4,042	0,0444
Blok 2					
TTT	0,645	0,613	0,677	1,706	0,1915
TΔT	0,217	0,116	0,318	23,033	1,5924E-6
ΔTT	0,100	0,199	0,000	42,478	7,1465E-11
ΔΔT	0,020	0,040	0,000	7,912	0,0049
TTΔ	0,016	0,026	0,005	2,709	0,0998
Blok 3					
CG	0,917	0,833	1,000	34,951	3,3817E-9
ΔC	0,062	0,125	0,000	25,56	4,2877E-7
ΔG	0,016	0,031	0,000	6,131	0,0133

Δ - oznacza wariant delecyjny

Tabela nr 25. Analiza istotności statystycznej haplotypów dla genu IGF1R

LP	Nazwa wariantu	Pozycja genomowa Hg19	Częstość grupa badana	Częstość grupa kontrolna	Test Chi ²	Wartość p	Hardy - Weinberg wartość p
1	nowy T>G (rs768733704 T>C)	Chr15:99192768 5'UTR	0,068	0,000	13,456	2,0E-4	1,0
2	rs45506098	Chr15:99459278 Ekson 9/22	0,026	0,000	5,066	0,0244	1,0
3	rs745660795	Chr15:99491786 Intron 19/22	0,021	0,000	4,042	0,0444	1,0
4	nowy delTAAA (rs398028512 del/dup A _n)	Chr15:99503083 3'UTR	0,245	0,000	53,555	2,5147E-13	9,3911E-26
5	rs397836919	Chr15:99503522 3'UTR	0,844	0,682	13,84	2,0E-4	1,8662E-9
6	rs375554267	Chr15:99503526 3'UTR	0,031	0,005	3,638	0,0565	1,0
7	nowy delC (rs76133807 C>T)	Chr15:99506411 3'UTR	0,156	0,000	32,542	1,1662E-8	0,5855
8	nowy G>C (rs1434439068 G>T)	Chr15:99506415 3'UTR	0,135	0,000	27,888	1,2853E-7	0,8072
9	rs78894779	Chr15:99506979 3'UTR	0,021	0,000	4,042	0,0444	1,0

W tabeli nr 26 zawarto analizę korelacji klinicznych pomiędzy istotnym statystycznie dominującymi polimorfizmami genu *IGF1R* a poszczególnymi badanymi parametrami metabolicznymi.

Dla polimorfizmu rs39783919 wykazano korelację z BMI >35 kg /m² i otyłością brzuszną a dla rs45506098 z insulinoopornością. Również dla nowego polimorfizmu (Lp.8) wykazano korelację z hiperlipidemią mieszaną.

Tabela nr 26: Korelacja danych klinicznych i polimorfizmów genu *IGFR1* (A,B,C)

A.

Gen	Polimorfizm	WHtR > 0,5		BMI 1 (30-34,99 kg/m ²)		BMI 2 (>35 kg/m ²)	
		OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p	OR [95%CI]	p
<i>IGF1R</i>	rs768733704	2,265	0,31673	0,478	0,16126	0,633	0,28101
<i>IGF1R</i>	rs45506098	0,836	0,55318	0,853	0,86580	0,419	0,43225
<i>IGF1R</i>	rs745660795	0,676	0,59784	1,759	0,62671	0,569	0,62671
<i>IGF1R</i>	nowy, del TAAA, (w regionie rs1434149464 i rs398028512)	5,061	0,13331	1,304	0,59020	1,539	0,36230
<i>IGF1R</i>	_rs397836919	0,136	0,01213	0,650	0,37693	0,278	0,00896
<i>IGF1R</i>	nowy delC (rs76133807 C>T)	0,488	0,52683	0,421	0,21116	0,468	0,35129
<i>IGF1R</i>	rs76133807	0,535	0,48318	2,994	0,06073	1,818	0,22928
<i>IGF1R</i>	nowy G>C (rs1434439068 G>T)	0,343	0,19203	1,413	0,48030	1,406	0,46803
<i>IGF1R</i>	rs78894779,	0,676	0,59784	5,557	0,12173	1,788	0,56543

B.

Gen	Polimorfizm	Hipercholesterolemia		Hiperlipidemia mieszana		Insulinooporność	
		OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p	OR [95% CI]	p
<i>IGF1R</i>	rs768733704	0,553	0,34932	0,474	0,34639	0,633	0,48379
<i>IGF1R</i>	rs45506098	2,092	0,42206	1,971	0,46510	0,178	0,04481
<i>IGF1R</i>	rs745660795	4,263	0,18230	3,000	0,26471	2,914	0,26194
<i>IGF1R</i>	nowy, del TAAA, (w regionie rs1434149464 i rs398028512)	0,686	0,43042	0,454	0,18341	0,405	0,07619
<i>IGF1R</i>	rs397836919	1,359	0,52327	1,312	0,60635	0,561	0,28356
<i>IGF1R</i>	nowy delC (rs76133807 C>T)	0,352	0,19185	0,129	0,06149	0,567	0,44692
<i>IGF1R</i>	rs76133807	0,457	0,13841	0,859	0,79201	0,954	0,93607
<i>IGF1R</i>	nowy G>C (rs1434439068 G>T)	0,498	0,14951	0,285	0,04845	0,754	0,59332
<i>IGF1R</i>	rs78894779	0,433	0,46454	0,944	0,96132	0,900	0,92889

C.

Gen	Polimorfizm	Zespół metaboliczny	
		OR [95% CI]	p
<i>IGF1R</i>	rs768733704	0,526	0,3
<i>IGF1R</i>	rs45506098	0,85	0,86
<i>IGF1R</i>	rs745660795	4,077	0,19
<i>IGF1R</i>	nowy, del TAAA, (w regionie rs1434149464 i rs398028512)	1,262	0,61
<i>IGF1R</i>	rs397836919	1,351	0,59
<i>IGF1R</i>	nowy delC (rs76133807 C>T)	1,689	0,45
<i>IGF1R</i>	rs76133807	0,571	0,27
<i>IGF1R</i>	nowy G>C (rs1434439068 G>T)	0,594	0,27
<i>IGF1R</i>	rs78894779	1,300	0,79

5.2.4 Podsumowanie wyników

W przypadku 19 stwierdzonych polimorfizmów, które wykazywały istotność statystyczną 5 z nich występowało częściej w grupie kontrolnej co sugeruje ich ochronną rolę przed otyłością, pozostałe natomiast sprzyjały rozwojowi otyłości.

W poniższej tabeli nr 27 zamieszczono wszystkie polimorfizmy mające istotność statystyczną z określeniem częstości występowania allelu rzadkiego (MAF).

Tabela nr 27: Polimorfizmy badanych genów wykazujące istotność statystyczną ($p < 0,05$)

Gen	Region	Polimorfizm	Otyłość	*MAF (GnomAD, wszystkie populacje)
<i>ESR1</i>	intron	rs55716045	sprzyjający	0,00315
<i>ESR2</i>	3'UTR	rs28440970	ochronny	0,0598
<i>AR</i>	intron	brak	ochronny	brak danych
<i>AR</i>	3'UTR	rs1282212747	sprzyjający	brak danych
<i>AR</i>	3'UTR	brak	sprzyjający	brak danych
<i>ADRB3</i>	3'UTR	rs544651920, rs747043938, , multiple alleles del(AC)3 / delACAC / delAC / dupAC / dupACAC / dup(AC)3	sprzyjający	brak danych
<i>ADRB3</i>	3'UTR	rs3990401, del(AC)3 / delACAC / delAC / dupAC / dupACAC	ochronny	brak danych
<i>INSR</i>	3'UTR	rs72988602	ochronny	0,0449
<i>INSR</i>	3'UTR	rs1220091470	sprzyjający	0,00003
<i>INSR</i>	intron	rs148813626	sprzyjający	0,00971

*MAF – (ang. *Minor Allele Frequency*) – częstość występowania rzadkiego allelu;

Tabela nr.28 Polimorfizmy dla genu *IGF1R* wykazujące istotność statystyczną ($p < 0,05$)

Gen	Region	polimorfizm	Otyłość	*MAF
<i>IGF1R</i>	5'UTR	rs768733704	sprzyjający	0,00058
<i>IGF1R</i>	exon	rs45506098	sprzyjający	0,00776
<i>IGF1R</i>	intron	rs745660795	sprzyjający	0,00001
<i>IGF1R</i>	3'UTR	nowy, del TAAA, (w regionie rs1434149464 i rs398028512)	sprzyjający	brak danych
<i>IGF1R</i>	3'UTR	rs397836919	ochronny	0,00001
<i>IGF1R</i>	3'UTR	nowy delC (rs76133807 C>T)	sprzyjający	brak danych
<i>IGF1R</i>	3'UTR	rs76133807	sprzyjający	0,005
<i>IGF1R</i>	3'UTR	nowy G>C (rs1434439068 G>T)	sprzyjający	0,002
<i>IGF1R</i>	3'UTR	rs7889477	sprzyjający	0,0047

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

W przypadku 5 polimorfizmów zamieszczonych w tabeli nr 29 wykazano korelacje z występowaniem otyłości olbrzymiej, otyłości brzusznej, hiperlipidemii mieszanej,

insulinooporności i zespołu metabolicznego. Najwięcej, aż 3 z nich to polimorfizmy genu *IGF1R* z czego jeden z nich był to nowo stwierdzony - wariant dotychczas nie raportowany.

Tabela nr 29: Polimorfizmy badanych genów w korelacji z cechami klinicznymi w badanej grupie

Gen	<i>ADRB3</i>	<i>INSR</i>	<i>IGF1R</i>	<i>IGR1R</i>	<i>IGFR1R</i>
Polimorfizm/rs /pozycja genom.	rs3990401	rs72988602	rs45506098	rs39783691	nowy G>C (rs1434439068 G>T)
BMI>35 kg/m ²				p=0,00896	
WHTR	p=0,004896				
Hiperlipidemia mieszana					p=0,004845
insulinooporność			p=0,00896	p=0,01213	
Zespół metaboliczny		p=0,04			

6. Dyskusja i omówienie wyników:

Otyłość tak jak i inne powszechnie występujące schorzenia przewlekłe jest uwarunkowana przez wiele czynników. Poza istotnymi czynnikami środowiskowymi (jakim jest np. dieta) szczególną rolę przypisuje się także czynnikom genetycznym. Defekty jednego genu (jak *MC4R* czy *FTO*) rzadko są przyczyną tej choroby, podkreśla się raczej udział wielu czynników genetycznych, których współdziałanie może w konsekwencji zwiększać predyspozycję do wzrostu masy ciała i sprzyjać pojawianiu się innych schorzeń takich jak nadciśnienie tętnicze czy hiperlipidemia. Wykorzystanie nowoczesnych technik badań genetycznych umożliwiających jednoczesowe badanie wielu genów (NGS), całych sekwencji kodujących (WES – ang. *whole exome sequencing*) czy całego genomu (WGS – ang. *whole genome sequencing*) przyniosło wiele cennych informacji na temat wielogenowych uwarunkowań rozwoju wielu chorób. Wiele mówi się na temat udziału poszczególnych hormonów w rozwoju otyłości przy czym szczególną uwagę zwraca się na działanie insuliny i glikokortykosteroidów (Thomas DD, 2019) ale najczęściej bada się występowanie zmian genetycznych w zróżnicowanych zdrowotnie populacjach bez odniesienia do konkretnych grup kontrolnych. Do tej pory nie wykonano kompleksowego, jednoczesnego badania genów receptorów hormonów przy użyciu metody NGS zarówno u kobiet z otyłością jak i u kobiet z

prawidłową masą ciała. W dalszej części pracy zostaną przedyskutowane wyniki badań własnych w odniesieniu do tych do tej pory opublikowanych.

RECEPTORY JĄDROWE

Receptory estrogenów - geny: *ESR1* i *ESR2*

Estrogeny mają wpływ zarówno na pobieranie pokarmu jak i na regulację centralnych mechanizmów wydatku energetycznego. Wpływają także na dystrybucję tkanki tłuszczowej zmniejszając ilość tłuszczu trzewnego i zwiększając zawartość tłuszczu w tkance podskórnej. Wpływ estrogenów na tkankę tłuszczową wymaga obecności aktywnego receptora estrogenowego alfa ($ER\alpha$) kodowanego przez gen *ESR1*. Estrogeny (głównie estriol) łączą się także z receptorem beta ($ER\beta$) kodowanym przez gen *ESR2*. Geny tych receptorów znajdują się w różnych chromosomach (*ESR1* w chromosomie 6 a *ESR2* w chromosomie 14) (Eaton SA, 2019; Lee H-R, 2012). Wymienione receptory estrogenów należą do grupy receptorów jądrowych (NR3A1 i NR3A2) i charakteryzują się wysokim stopniem homologii. Związanie estrogenów z tymi receptorami i następnie związanie powstałego kompleksu ze specyficznymi domenami w obrębie DNA (tzw. ERE – *Estrogen Responsive Elements*) powoduje uaktywnienie transkrypcji określonych genów (Lee H-R, 2012; Palmisano BT, 2017). Na przykład w wątrobie ponad 1000 ludzkich genów pozostaje pod kontrolą hormonów płciowych (Zhang Y, 2011). Wpływ estrogenów (zarówno tych krążących we krwi jak i powstających w obrębie tkanki tłuszczowej) na powstawanie otyłości i dystrybucję tkanki tłuszczowej był szeroko badany u myszy pozbawionych (tzw. *knockout mouse*) genów poszczególnych receptorów estrogenów włączając w to analizę wpływu estrogenów na procesy zapalne, które biorą również udział w patogenezie otyłości jak to wspomniano we wstępie tej dysertacji. Istnieje także błonowy receptor estrogenów – jest on jednak kodowany przez inny gen i wiąże się z regulacją aktywności białek transdukcji sygnału w komórce (Eaton SA, 2019; Levin ER, 2005).

Do tej pory ukazało się niewiele analiz dotyczących występowania polimorfizmów genów *ESR1* i *ESR2* u osób z otyłością. Doo i wsp. zasugerowali znaczenie ochronne polimorfizmu rs1884051 genu *ESR1* w odniesieniu do masy ciała, WHR jak i zawartości tkanki tłuszczowej u mężczyzn z populacji koreańskiej (Doo M, 2011). Z kolei Yang i wsp. w przeprowadzonej metaanalizie stwierdzili, że allel C polimorfizmu rs2234693 (Pvull) genu

ESR1 pełni rolę ochronną w rozwoju cukrzycy typu 2 szczególnie u osób z populacji chińskiej, natomiast allel G polimorfizmu rs9340799 (XbaI) ma takie samo znaczenie w populacji kaukaskiej. Obecność obu polimorfizmów nie wiązała się natomiast z ryzykiem rozwoju zespołu metabolicznego (Yang J, 2018) W badaniach przeprowadzonych przez Saltiki i wsp. polimorfizm rs4986938 (G>A) genu *ESR2* sprzyjał większej masie ciała i wyższemu stężeniu cholesterolu u kobiet po menopauzie (Saltiki K, 2009)

Wyniki badań przeprowadzonych u kobiet z otyłością i kobiet z grupy kontrolnej przedstawionych w niniejszej pracy wskazują na obecność 7 polimorfizmów genu *ESR1*, w tym 4 nowo wykrytych i 8 polimorfizmów genu *ESR2*, w tym 3 nigdy nie raportowanych wcześniej (załączniki nr 1 i 2). Występowanie polimorfizmu rs55716045 w sekwencji intronowej genu *ESR1* u kobiet z otyłością wydaje się być czynnikiem sprzyjającym rozwojowi tej choroby, aczkolwiek liczba kobiet u których stwierdzono jego obecność była bardzo mała. Podobna sytuacja występuje w przypadku polimorfizmu rs28440970 genu *ESR2*, który występuje w regionie 3' UTR i może mieć działanie ochronne jako, że stwierdzono go tylko (choć również w niewielkiej liczbie) u kobiet bez otyłości. Pochopnym wydaje się wobec tego wyciąganie wniosków, że polimorfizmy genów receptorów estrogenów mogą mieć udział w predyspozycji do otyłości. Do podobnej konkluzji doszła też Nilsson i wsp. w badaniu wpływu wielu polimorfizmów obu genów na rozwój otyłości i procesy lipolizy (Nilsson M, 2007). Tym niemniej ze względu na szczególny wpływ estrogenów na rozwój otyłości i zespołu metabolicznego warto kontynuować badania związane z aktywnością ich receptorów i znaczeniem zmian genetycznych w tych chorobach.

Receptor androgenów – gen *AR*

Hiperandrogenizm występuje u około 10% kobiet w wieku rozrodczym (Sancho R , 2012). Jest on często skojarzony z zespołem metabolicznym w tym otyłością. Może on poprzedzać wystąpienie otyłości jak i być jej następstwem. Często wiąże się także z opornością na insulinę. Nadmiar androgenów sprzyja przede wszystkim akumulacji tłuszczu trzewnego i stłuszczeniu wątroby co w konsekwencji prowadzi do insulinooporności (Pasquali R , 2019).

Poza stężeniem androgenów we krwi u kobiet istotnym czynnikiem warunkującym ich wpływ na organizm jest funkcjonalność receptora androgenów. Receptor ten, podobnie jak receptor estrogenów należy do rodziny receptorów jądrowych (NR3C4) i stanowi czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję genów. Podobnie jak receptor estrogenów ma także zdolność wiązania się z cytoplazmatycznymi białkami transdukcji sygnału. Receptor ten jest kodowany przez gen znajdujący się na chromosomie X i pojawia się w wielu różnych tkankach organizmu. Badania wykonywane na myszach udowodniły, że aktywność receptora androgenów ma związek poza otyłością trzewną także z insulinoopornością, późnym występowaniem otyłości oraz zwiększonym stężeniem leptyny i adiponektyny (Davey RA, 2016).

Większość badań nad wpływem zmian genetycznych w obrębie genu AR skupia się na ocenie długości powtórzeń tripletu nukleotydów CAG w eksonie 1 genu (zazwyczaj liczba powtórzeń wynosi 10-35) w różnych sytuacjach klinicznych. W odniesieniu do otyłości badania te były głównie wykonywane u mężczyzn lub młodych chłopców (Tirabasi G, 2015,). Wyniki badań prowadzonych m.in. przez Pausova i in. sugerują, że, że mała liczba powtórzeń CAG może być czynnikiem ryzyka otyłości brzusznej i nadciśnienia tętniczego u chłopców, ale nie u dziewcząt (Pausova Z, 2010). Odwrotne wyniki badań u dorosłych mężczyzn otrzymali Stanworth i Mohlig wykazując skojarzenie większej liczby powtórzeń CAG z otyłością, stężeniem leptyny oraz insulinoopornością (Stanworth RD, 2008; Mohlig M, 2011). Kolejne z niewielu badań u dziewcząt przeprowadzili Lardone i Rodriguez-Gonzalez wykazując, że dłuższe powtórzenia CAG w eksonie 1 genu AR prawdopodobnie chronią kobiety przed dyslipidemią (Rodriguez-Gonzalez G, 2009), ale mogą sprzyjać otyłości brzusznej (Lardone MC, 2019,). Jak widać z powyższych badań wyniki są sprzeczne i udział polimorfizmów eksonu 1 genu AR w rozwoju otyłości i składowych zespołu metabolicznego wydaje się kontrowersyjny.

W badaniach własnych nie analizowano liczby powtórzeń CAG z powodu trudności w amplifikacji powtórzeń CAG za pomocą zwykłej polimerazy którą stosuje się do tworzenia bibliotek genomowych. Fragment ten wymaga osobnej analizy za pomocą wysoc-specyficznych polimeraz przeznaczonych dla powielania fragmentów bogatych w GC i odpowiedniego profilu termalnego PCR, ze względu na podwyższoną siłę wiązania nici DNA w regionach bogatych w GC. Niemniej wykryto 31 innych rzadkich polimorfizmów (MAF<0,1) zlokalizowanych w różnych fragmentach genu AR. Analiza istotności statystycznej

tych wykrytych polimorfizmów wykazała, że trzy z nich mogą mieć związek z występowaniem otyłości – przy czym dwa z nich mogą tej otyłości sprzyjać: rs1282212747 w eksonie 8 genu AR oraz nowo odkryty wariant w pozycji genomowej chrX:66949841 (T>A) w regionie 3'UTR tego genu. Trzeci z nich – w pozycji genomowej chrX:66931222 (A>G) zlokalizowany w intronie 3 genu AR może mieć potencjalny efekt ochronny w odniesieniu do otyłości u badanych kobiet. Żaden z tych trzech polimorfizmów nie był wcześniej raportowany pod względem częstości występowania w różnych populacjach i w odniesieniu do jakichkolwiek chorób.

Receptor mineralokortykoidów – gen *NR3C2*

Receptor mineralokortykoidów (*NR3C2*) należy podobnie jak receptor estrogenów i receptor androgenów do receptorów jądrowych i jego aktywność związana jest z efektami genomowymi. Efekty poza genomowe związane są z aktywacją receptora błonowego GPR30. Receptor ten wiąże przede wszystkim z aldosteronem ale także z kortyzolem. Gen receptora mineralokortykoidów *NR3C2* znajduje się na chromosomie 4 (*Fuller PJ, 2015*). Badania epidemiologiczne wykazują ewidentną korelację pomiędzy stężeniem aldosteronu a występowaniem zespołu metabolicznego (*Marzolla V, 2012*). Zwiększone stężenie tego hormonu sprzyja insulinooporności i nadciśnieniu tętniczemu a także nieprawidłowej sekrecji adipokin, zwiększonej produkcji wolnych rodników i stanowi zapalnemu poprzez zwiększenie ekspresji genów prozapalnych cytokin takich jak $TNF\alpha$ czy PAI-1. W sytuacjach fizjologicznych aldosteron sprzyja różnicowaniu białej tkanki tłuszczowej (*Even SE, 2014; Vecchiola A, 2016*). Jedne z nielicznych badań polimorfizmów *NR3C2* w odniesieniu do wskaźników antropometrycznych wykazały, że polimorfizm rs5522 (A>G) może wiązać się z obecnością wyższego BMI i stężenia LDL-cholesterolu (*Fernandez-Rosa FL, 2010*).

Wyniki badań własnych wskazują na obecność 14 polimorfizmów genu *NR3C2*, z których żaden nie osiągnął istotności statystycznej w porównaniu z grupą kontrolną bez otyłości. Żaden z nich nie wiązał się także ze szczególną składową zespołu metabolicznego jak np. otyłość brzuszna czy insulinooporność. Stawia to pod znakiem zapytania znaczenie polimorfizmów genu *NR3C2* w patogenezie otyłości i zespołu metabolicznego.

RECEPTORY ZWIĄZANE Z BIAŁKIEM G

Receptor beta-3-adrenergiczny – gen *ADRB3*

Receptor β_3 adrenergiczny ma szczególne znaczenie w regulacji metabolizmu, ponieważ jego ekspresja odbywa się w białej i brązowej tkance tłuszczowej (*Cypess AM, 2015*). Jego aktywacja wiąże się z indukcją lipolizy i termogenezy (*Atigie C, 1997*).

Prowadzone do tej pory badania genetyczne nad polimorfizmami genu *ADRB3* koncentrowały się głównie na polimorfizmie rs4994 (p.Trp64Arg, MAF>0,1-0,2) wykazując, że polimorfizm ten może wiązać się ze zmniejszeniem tempa metabolizmu, wyższym BMI i zwiększonym ryzykiem otyłości brzusznej oraz nadciśnienia tętniczego, niemniej wyniki prowadzonych badań są nadal nieprzekonujące (*Katsarou MS, 2018*). W badanej grupie wariant rs4994 wykazał również wysoką częstość (MAF>0,18) niemniej nie wykazano jego istotności statystycznej dla otyłości.

Badania wykazały natomiast obecność 10 rzadkich polimorfizmów genu *ADRB3* (z czego 2 polimorfizmy: rs747043938 i rs3990401 wykazywały różnicę istotną statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną. Polimorfizm rs747043938 występując znacznie częściej w grupie z otyłością wydaje się być polimorfizmem o charakterze sprzyjającym chorobie a polimorfizm rs3990401 występujący częściej w grupie bez otyłości ma prawdopodobnie charakter ochronny. Ten drugi polimorfizm ma prawdopodobnie także działanie ochronne przed wystąpieniem otyłości brzusznej. Oba istotne polimorfizmy wykryto w sekwencjach 3'UTR.

Receptor melanokortyny – gen *MC4R*

Receptor melanokortyny 4 (MC4R) odgrywa istotną rolę w kontroli pobierania pokarmu i wydatkowania energii. Receptor ten występuje w różnych regionach mózgu w tym jądrze przykomorowym podwzgórza. Jego aktywność jest związana z leptyną. Aktywacja receptora LEPR na komórkach wydzielających proopiomelanokortynę – prekursor również melanokortyny (MC) powoduje wydzielanie tego hormonu. Połączenie MC z MC4R jest z kolei sygnałem do wydzielania czynników znoszących łaknienie takich jak np. BDNF.

Mutacje powodujące utratę funkcji przez receptor dla melanokortyny wiążą się często z zaawansowaną otyłością. Do chwili obecnej wykryto ponad 370 polimorfizmów pojedynczo-nukleotydowych w regionie genu *MC4R* (Fairbrother U, 2018).

Badania własne pozwoliły na wykrycie tylko 5 opisanych, rzadkich polimorfizmów genu *MC4R*, spośród nich 4 to zmiany niesynonimiczne a jeden to wariant w regionie 5'UTR. Niemniej, żaden z nich nie osiągnął istotności statystycznej w porównaniu z grupą kontrolną w związku z tym ich udział w rozwoju otyłości wydaje się być znikomy.

RECEPTORY ZWIĄZANE Z KINAZAMI

Receptor insuliny – gen *INSR*

Insulina odgrywa niezmiernie istotną rolę w regulacji procesów metabolicznych. Hormon ten stymuluje transport glukozy i kwasów tłuszczowych do wnętrza komórek, stymuluje także syntezę lipidów i hamuje lipolizę (Laviola L, 2006). Insulina bierze także udział w modulacji końcowego stadium różnicowania adipocytów poprzez zwiększenie ekspresji *PPAR γ* , nadrzędnego genu regulującego adipogenezę (Cignarelli A, 2016). Ponadto ekspresja i uwalnianie wielu cząsteczek o udowodnionym działaniu parakrynnym i endokrynnym (np. adiponektyna, leptyna, apelina, rezystyna i in.) pozostaje pod wpływem insuliny (Cignarelli A, 2019).

Receptor insuliny jest jednym z członków podrodziny receptorów insuliny, która poza nim obejmuje także receptor *IGF1* (wiązący IGF-1 i IGF-2) i tzw. sierocy zależny od receptora insuliny receptor (ang. IRRR; *insulin receptor-related receptor*) (De Meyts P, 2016). Receptory insuliny i IGF-1 są pod wieloma względami homologiczne w swojej strukturze. Jednak, podczas gdy insulina odpowiada za regulację metabolizmu glukozy i lipidów w mięśniach, wątrobie i tkance tłuszczowej to IGF-1 bierze udział w długoterminowej kontroli wzrostu większości tkanek. Oba receptory mają też zdolność tworzenia hybrydowego receptora, który wiąże tylko IGF-1, ale nie insulinę (Sesti G, 2001).

W do tej pory opublikowanych badaniach genetycznych dotyczących zmian w obrębie genu receptora insuliny (*INSR*) niewiele jest odniesień do otyłości. Takie badania przeprowadzili Hassan i wsp. w grupie 130 dzieci i ich otyłych matek badając m.in. polimorfizmy *IGF1R* zlokalizowane w eksonie 17. Nie wykazali oni jednak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupami o różnych BMI (Hassan NE, 2017,). Jones i wsp. wykazali obniżoną ekspresję *INSR* w podskórnej tkance tłuszczowej u otyłych chorych z zespołem policystycznych jajników co może być przyczyną insulinooporności u tych chorych (Jones MR, 2015,). Z kolei badania Wanga i wsp. oraz Bodhini i wsp. pokazały, że synonimiczny polimorfizm genu rs1799817 (p.His1085His) występuje częściej u osób z insulinoopornością i cukrzycą typu 2. Ten polimorfizm był analizowany osobno w badanej populacji (MAF.0,2) ale nie wykazał istotności statystycznej (Wang CH, 2010; Bodhini D, 2012)

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy wykazano obecność 57 relatywnie rzadkich (MAF<0,1) polimorfizmów genu *INSR* z czego 3 polimorfizmy były istotne statystycznie. Dwa z nich: rs1220091470 (w sekwencji 3'UTR) i rs148812626 (w sekwencji intronowej) występowały częściej u osób otyłych wobec tego mogłyby sprzyjać otyłości a trzeci rs72988602 (również w sekwencji 3'UTR) występujący w grupie bez otyłości może prawdopodobnie wiązać się z mechanizmem ochronnym. Żaden z tych polimorfizmów nie miał jednak znaczenia istotnego statystycznie dla insulinooporności, nadciśnienia tętniczego i innych badanych parametrów metabolicznych.

Receptor insulino-podobnego czynnika wzrostu 1 – gen *IGF1R*

Insulino-podobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1) jest hormonem białkowym produkowanym głównie przez wątrobę w odpowiedzi na stymulację hormonem wzrostu (GH). IGF-1 jest mediatorem GH w zakresie funkcji anabolicznych i promujących wzrost. IGF-1 wykazuje homologię do proinsuliny oraz do insulino-podobnego czynnika wzrostu 2 (IGF-2). Działania endokryne, autokryne i parakryne IGF-1 odbywają się poprzez aktywację przez IGF-1 jego receptora (*IGF1R*), który należy do receptorów związanych z kinazą tyrozynową i występuje praktycznie w każdej komórce. Związanie z receptorem powoduje aktywację

ścieżek sygnałowych PI-3K/Akt i Ras-MAPK biorących udział w regulacji procesów proliferacji komórek, ich przeżycia oraz angiogenezy i inwazji (Orru S, 2017). IGF-1 wykazuje zdolność promocji wychwytu glukozy choć jego aktywność w tym względzie stanowi ok. 4-7% aktywności insuliny (Elahi D, 1993). Delecja *IGF1R* w mięśniach szkieletowych powoduje pojawienie się oporności na insulinę we wczesnym wieku (Fernandez AM, 2001). IGF-1 promuje różnicowanie preadipocytów aczkolwiek po ukończeniu różnicowania tracą one *IGF1R* delegując jego funkcje na receptor insuliny. Stąd w tkance tłuszczowej IGF-1 w fizjologicznym stężeniu nie wpływa na stymulację syntezy bądź degradacji lipidów i jedynie w wysokich stężeniach jest zdolny stymulować transport glukozy do komórek poprzez receptor insulinowy (DiGirolamo M, 1986). IGF-1 wpływa na transport kwasów tłuszczowych do mięśni i wyhamowanie jego akcji powoduje poważne konsekwencje w postaci oporności na insulinę i cukrzycy. Dzieje się tak ponieważ w tej sytuacji wątroba wychwytuje krążące kwasy tłuszczowe, które interferują z insuliną i IGF-1 co ostatecznie prowadzi do stłuszczenia wątroby. W ostatnich latach wiele badań zostało przeprowadzonych w odniesieniu do istotnej roli IGF-1 w rozwoju zespołu metabolicznego wskazując zwłaszcza na ujemną korelację pomiędzy IGF-1 a różnymi markerami otyłości, zespołu metabolicznego, cukrzycy typu 2 i chorób sercowo-naczyniowych. Nadal jednak podkreśla się fakt konieczności prowadzenia kolejnych badań nad dokładnym mechanizmem tych zależności (Aguirre GA, 2016; Friedrich N, 2012).

Region genu receptora IGF1 należy do bardzo polimorficznych (de Alencar SA, 2010). Co jest jednak zaskakujące - jak dotąd nie przeprowadzono zbyt wielu badań nad związkiem polimorfizmów tego regionu z rozwojem otyłości czy zespołu metabolicznego lub cukrzycy typu 2. Badania prowadzone przez Sookoian i wsp. wykazały, że polimorfizm o wysokiej częstości rs2684761 (MAF>0,4) ma istotne powiązanie z opornością na insulinę i nadciśnieniem tętniczym (Sookoian S, 2010). Z kolei Macdonald ze wsp. udowodniła, że polimorfizm „G1013A” (nazwa zwyczajowa, nieprawidłowa wg aktualnej nomenklatury genetycznej), genu *IGF1R* moduluje ryzyko otyłości u chorych z rakiem przełyku (Macdonald 2009).

W badaniach własnych w obu grupach badanych stwierdzono 114 polimorfizmów genu *IGF1R* z czego 9 osiągnęło istotność statystyczną. Osiem z tych polimorfizmów występowało jedynie w grupie kobiet z otyłością co wydaje się sprzyjać temu schorzeniu, podczas gdy jeden (rs1382313874 / rs397836919) występował głównie w grupie kobiet bez

otyłości co może świadczyć o jego ochronnym charakterze. Ten ostatni polimorfizm sprzyjał też poza niższym BMI także mniejszej tendencji do insulinooporności. Dwa z polimorfizmów sprzyjających otyłości wiązały się również z większym ryzykiem insulinooporności i hiperlipidemii. Co szczególnie istotne większość tych polimorfizmów była zlokalizowana w regionie 3'UTR genu *IGF1R*. O znaczeniu tej lokalizacji wspomniano w kolejnym podrozdziale dyskusji. Wyniki te ewidentnie świadczą o konieczności prowadzenia dalszych badań nad rolą zmian genetycznych w *IGF1R* w odniesieniu do składowych zespołu metabolicznego.

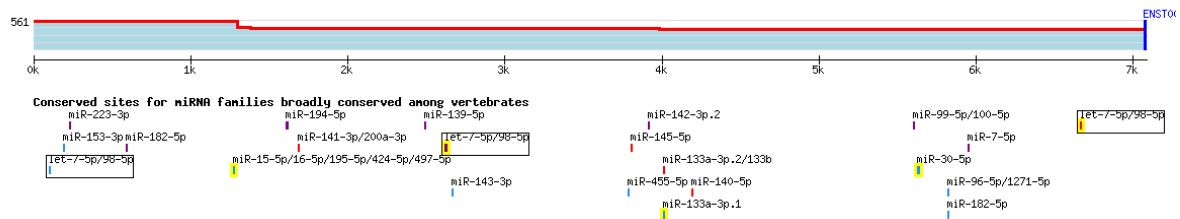
POLIMORFIZMY W REGIONACH UTR (ang. *untranslated regions*)

Spośród analizowanych wariantów w genach wyselekcjonowanych do badań, zaobserwowano że istotność statystyczną uzyskano dla polimorfizmów zlokalizowanych sekwencjach niekodujących tj. w regionach 5' i 3'UTR jak również w sekwencjach intronowych, co jest nowym odkryciem. Najwięcej wariantów zlokalizowano w genie insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF1R, który pod względem budowy jest największym spośród analizowanych genów. Gen *IGF1R* składa się z 21 eksonów, a największy transkrypt składa się z ponad 1367 aminokwasów (12 235 pz sekwencji kodującej). Warto zauważyć że gen posiada również długie sekwencje nie ulegające transkrypcji 5' oraz 3' UTR których wielkość wynosi ponad 7 Kpz co stanowi ponad połowę wielkości sekwencji kodującej najdłuższego transkryptu (Ullrich, A, 1986). Gen *IGF1R* wykazuje aktywność receptora kinazy tyrozynowej co sugeruje zaangażowanie w procesy przekazywania sygnałów molekularnych i komunikację międzykomórkową. W badanych grupach zidentyfikowano i przeanalizowano 115 wariantów nukleotydowych. Ponad połowa wykrytych zmian dotyczyła sekwencji regulatorowych poza sekwencją kodującą genu. Należy tu wymienić sekwencje regulatorowe 5' i 3'UTR, w szczególności w okolicy promotora i w okolicach intronowych, zlokalizowanych blisko granicy z eksonami. Białko receptora względu na długość sekwencji kodującej i genomowej stanowi duże wyzwanie w analizie. Stąd większość opracowań koncentruje się tylko na zmienności w obrębie eksonów, gdzie jednoznacznie można powiązać zmiany aminokwasowe wraz z efektem w postaci upośledzenia ekspresji lub funkcji białka.

Sekwencje proksymalne genu w okolicach 5'UTR zawsze stanowiły atrakcyjny cel dla badaczy oraz badań funkcjonalnych ze względu na obecność sekwencji promotorowych, oraz mnogość miejsc wiązania dla czynników transkrypcyjnych (tzw. enhancerów i silencerów). Dlatego też w tych regionach wykrywa się wiele zmian nukleotydowych, które nierzadko charakteryzują się bardzo wysoką patogennością, porównywaną do zmian w obrębie ramki odczytu (ang. *frameshift*) lub do wprowadzenia przedwczesnego sygnału stop (ang. PTC, *premature termination signal*). Regiony 3'UTR w genetyce medycznej są często bagatelizowane ze względu na trudność udokumentowania korelacji przyczynowo-skutkowej i konieczności przeprowadzenia zaawansowanych badań funkcjonalnych. Należy jednak wspomnieć, że regiony te odgrywają istotną rolę w ekspresji białka determinując przy tym końcowe przeznaczenie mRNA. Wiele procesów rozwojowych takich jak różnicowanie tkankowe, neurogeneza, determinacja płci zależy od potranskrypcyjnej regulacji w którą bezpośrednio zaangażowany jest 3'UTR. Stabilność transkryptu, jego lokalizacja komórkowa, wydajność translacji, wiązanie rybonukleoprotein oraz miRNA, czy interakcje białkowe to część najważniejszych funkcji molekularnych jakie sekwencje 3'UTR pełnią w każdej komórce (Mayr C, 2018). Szerokie podejście do analizy całych sekwencji genomowych (ang. WGS, *whole genome sequencing*) i niepoprzestanie na analizie tylko fragmentów kodujących (ang. WES, *whole exome sequencing*) wpisuje się w aktualny trend badań nad chorobami o dużej częstości, gdzie różne czynniki genetyczne i środowiskowe wykazują ścisłą interakcję i wysoką dynamikę. Analizując region 3' nieulegający translacji (3'UTR) genu *IGF1R* zaobserwowano niezwykle wysoką konserwatywność ewolucyjną wśród kręgowców a szczególnie w gromadzie ssaków. Dla tego genu odnotowano ponad 200 rozproszonych miejsc wiązania miRNA (8-mio – i 7-miomerowych) z czego 60 niezwykle wysoce konserwatywnych (analiza z użyciem algorytmu TargetScan , <http://www.targetscan.org>).

Rycina nr 16 Schemat miejsc wiązania mRNA w obrębie 3'UTR genu *IGF1R*

Human *IGF1R* ENST00000268035.6 3' UTR length: 7088



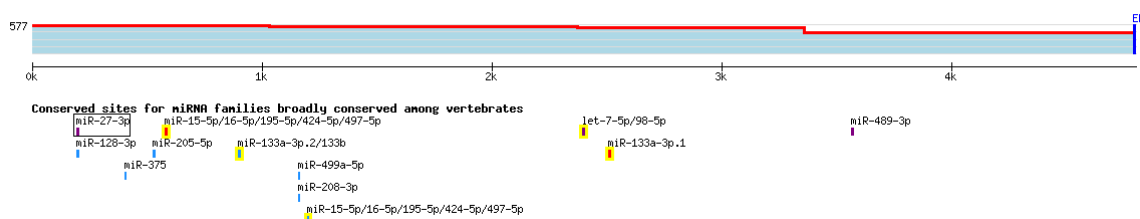
źródło: Target Scan

Kolejnym genem dla którego wykazano istotność statystyczną dla kilku wariantów nukleotydowych jest receptor insuliny *INSR*. Gen *INSR* podobnie jak *IGFR* jest duży i składa się z 21 eksonów kodujących białko. Długość sekwencji kodującej to niewiele ponad 4 kpz podczas gdy długość obydwu sekwencji UTR przekracza 5 kpz. Białko receptora składa się z dwóch homodimerów, a każdy z nich posiada domenę zewnątrzkomórkową alfa oraz część wewnątrz błonową beta, która również posiada aktywność kinazy tyrozynowej i możliwość transdukcji sygnałów komórkowych (Ullrich, A, 1985). Receptor jest aktywowany przez insulinę co wywołuje kaskadę przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych spośród których najważniejsze to Ras/RAF/MAP2K/MAPK, warunkujące wzrost komórkowy oraz różnicowanie tkankowe. Niezwykle ciekawym zjawiskiem jest interakcja z insulinopodobnymi czynnikami wzrostu IGF1 oraz IGF2, które receptor insuliny może wydajnie wiązać (bardziej wydajnie niż receptor IGF1R cząsteczki insuliny). Wspólna interakcja obydwu receptorów z tymi samymi czynnikami sygnałnymi sugeruje bliskie powiązanie i wspólne zaangażowanie w podobne procesy komórkowe.

Analizując region 3' nieulegający translacji genu *INSR* również zaobserwowano niezwykle wysoką konserwatywność ewolucyjną wśród kręgowców a szczególnie w gromadzie ssaków. Dla tego genu odnotowano ponad 180 rozproszonych miejsc wiązania miRNA (8-mio – i 7-miomerowych) z czego 45 niezwykle wysoce konserwatywnych.

Rycina nr 17 : Schemat wiązanie mRNA w obrębie 3'UTR genu *INSR*

Human *INSR* ENST00000341500.5 3' UTR length: 4801



źródło: Target Scan

PODSUMOWANIE

Szeroko zakrojone analizy genomowe w dużych grupach pacjentów niespokrewnionych, związane są z pewnymi ograniczeniami. W badaniach eksomu (WES) pomijane są sekwencje niekodujące i główną zaletą tej metody jest bezpośrednia detekcja zmian aminokwasowych i ich bezpośredniego wpływu na kodowane białko. Sekwencjonowanie umożliwia identyfikację również zmian nowych i do tej pory nieopisanych. W badaniach asocjacyjnych GWAS (ang. *genome wide association study*) analizowane są wybrane warianty genetyczne oraz *loci* rozproszone w genomie i zdefiniowane na macierzy. Zazwyczaj wykorzystuje się warianty o dużej i małej częstości (odpowiednio $MAF > 0,1$ i $> 0,05$) z tego względu GWAS nie nadaje się do identyfikacji zmian rzadkich i przyczynowych. W przeciwieństwie do WES, badania GWAS umożliwiają skanowanie całego genomu, niemniej również w ograniczonym zakresie wybranych SNP. W badaniach GWAS nie można wykryć zmian *de novo* oraz innych nie raportowanych wcześniej w bazach populacyjnych. Rozwiązaniem może być analiza danych pochodzących z sekwencjonowania genomu, co wymaga zastosowania wysokowydajnych i zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych ze względu na niezwykle dużą ilość danych genetycznych.

Jak wynika z przeprowadzonych badań zmiany genetyczne w genach receptorów hormonów mają istotne miejsce w rozważaniach na temat patogenezy otyłości. Dotychczas prowadzone nieliczne badania nad mutacjami i polimorfizmami genów receptorów hormonów uwzględniały głównie wykryte już wcześniej zmiany i często korelowano tylko jeden polimorfizm z określonym schorzeniem będącym składową zespołu metabolicznego. Wykorzystanie w niniejszych badaniach sekwencjonowania następnej generacji (NGS) obejmującego znacznie większe regiony genów i jednoczesowe badania wielu wariantów i wielu genów pozwoliło na wykrycie nowych nieopisywanych dotąd wariantów lub bardzo rzadkich o niezwykle niskiej częstości. Badania te wskazały także na obecność wyraźnych różnic populacyjnych w występowaniu SNP. Na świecie trwają obecnie badania nad wykorzystaniem wariantów genomowych o charakterze ochronnym wobec otyłości w tworzeniu nowych leków pozwalających na zmniejszenie masy ciała (Lotta La, 2019). W tej sytuacji wszelkie nowe informacje na temat tego typu zmian genomowych mają szczególne znaczenie.

7. WNIOSKI

1. Występowanie określonych polimorfizmów genów receptorów hormonów może mieć związek z pojawieniem się otyłości.
2. Częste występowanie polimorfizmów w obrębie genu receptora IGF-1 u kobiet z otyłością świadczy o ich potencjalnym udziale w rozwoju tego schorzenia.
3. Polimorfizm rs397836919 genu IGF1R ma charakter ochronny w odniesieniu do rozwoju otyłości olbrzymiej jak i insulinooporności.
4. Niewiele spośród rzadkich polimorfizmów występujących w regionach kodujących badanych genów wykazało istotność statystyczną.
5. Różnorodność wariantów statystycznie istotnych zlokalizowanych w sekwencjach niekodujących badanych genów może sugerować ich istotny wpływ na ekspresję białka (sekwencje regulatorowe) i wskazuje na konieczność badania tych regionów.
6. Wykrycie wielu nowych polimorfizmów genów receptorów hormonów świadczy o znacznej zmienności populacyjnej i konieczności tworzenia określonych populacyjnie baz danych genomowych.
7. NGS umożliwia wysokowydajną analizę całych sekwencji genomowych w porównaniu do metod tradycyjnie stosowanych (sekwencjonowanie konwencjonalne metodą Sangera, Real-Time PCR)

8. STRESZCZENIE

Otyłość jest przewlekłą, chorobą cywilizacyjną o coraz częściej występującą w większości krajów rozwiniętych. Prowadzi ona do powstania poważnych następstw takich jak choroby układu krążenia, cukrzyca czy choroby nowotworowe. Etiologia otyłości jest złożona-czynniki ewolucyjne, środowiskowe, genetyczne. Przeprowadzenie badań GWAS i badań umożliwiających zmapowanie ludzkiego genomu (Human Genom Project) pokazało że ok 600 genów może mieć związek z otyłością. Mutacje mogą dotyczyć genów odpowiadających za procesy przemiany materii, regulacji hormonalnej, procesów dojrzewania komórek w szczególności tkanki tłuszczowej.

Celem pracy była ocena występowania mutacji polimorfizmów genów receptorów różnych hormonów w grupie kobiet otyłych i kobiet bez otyłości. Oceniano geny receptorów estrogenów (*ESR1* i *ESR2*), androgenów (*AR*), mineralokortykoidów (*NR3C2*), beta 3 adrenoreceptora (*ADRB3*), melanokortyny 4 (*MC4R*), insuliny (*INSR*) i insulinopodobnego czynnika wzrostu (*IGF1R*). Wykorzystanie techniki sekwencjonowania następczej generacji (NGS) umożliwiło analizę w całym genie, również w regionach niekodujących, regulatorowych. Po wykonaniu analiz stwierdzono obecność 7 wariantów genu *ESR1*, w tym 4 nowo wykrytych, 8 wariantów genu *ESR* (3 nowe), 29 warianty genu *AR* (z tego 20 wcześniej nie opisywanych), 17 wariantów genu *NR3C2* (10 nowych), 13 w genie *ADRB* (6 nowych), 5 wykrytych wariantów genu *MC4R* (1 nowy), w 64 wariantach genu *INSR* (29 nowych). Największą grupę nowych polimorfizmów stanowiły warianty genu *IGF1R* 49 nowych z 115. W przypadku 19 wariantów wykazano istotność statystyczną. Większość rzadkich polimorfizmów (13) dotyczyła sekwencji regulatorowych genów takich regionów jak 3'UTR i 5'UTR. Większość dotychczasowych publikacji dotyczyła głównie znanych regionów kodujących, nie skupiano się jak w tym przypadku na obszarach regulujących. Większość z analizowanych istotnych statystycznie polimorfizmów sprzyjała otyłości. Pięć wariantów występujących w grupie kontrolnej ma prawdopodobne działanie ochronne- zabiegające otyłości. Kilka z nich chroni też przed insulinoopornością i otyłością trzewną. W wykonanych badaniach wykazano obecność różnorodnych wariantów w genach receptorów hormonów sprzyjających pojawianiu się otyłości i składowych zespołu metabolicznego oraz tych, które mogą mieć działanie ochronne.

Stwierdzono, że NGS jest użytecznym narzędziem pozwalającym na ocenę całego genu co zwiększa możliwości wykrycia nowych wariantów. Porównując uzyskane wyniki wariantów genów receptorów hormonów zauważono obecność wyraźnych różnic populacyjnych.

9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (ABSTRACT):

Obesity is a chronic, civilization-related disease that is common in developed countries. Obesity leads to serious consequences such as cardiovascular disease, diabetes and cancer. The etiology of obesity is related to many factors including evolution, environment and genetics. Using GWAS and other human genome mapping studies scientists have found over 600 genes that can be associated with obesity. Mutations of the certain genes may change response to hormones in different metabolic processes. They also may affect hormonal regulation and cell maturation processes, particularly in adipose tissue.

The aim of the study was to assess the occurrence of polymorphisms of hormone receptor genes in the group of obese and non-obese women. Genes for estrogen receptors (*ESR1* and *ESR2*), androgen receptor (*AR*), mineralocorticoid receptor (*NR3C2*), beta 3 adrenoreceptor (*ADRB3*), melanocortin 4 receptor (*MC4R*), insulin receptor (*INSR*), and insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*) were screened.

Next generation sequencing technique (NGS) was used in the study to detect whole gene (including regulatory and non-coding sequences) defects. Studies revealed 7 variants in *ESR1* gene (4 were new) 8 variants in *ESR2* gene (including 3 new), 29 variants in *AR* gene (20 never reported before), 17 variants in *NR3C2* gene (10 completely new), 13 variants in *ADRB3* gene (6 new), 5 variants of *MC4R* gene (1 new), 64 variants of *INSR* gene (29 new). The most polymorphic region was *IGF1R* gene with 49 new polymorphisms among all 115 variants discovered. Statistical significance was proved for 19 variants from total group. These significant variants were mostly located in the regulatory sequences like 5'UTR or 3'UTR. Recently published study were concentrated only on the known polymorphisms in coding regions, so this location was not extensively studied. Five variants occurring in control group seem to be protective against obesity and some them also against insulin resistance and visceral obesity.

These studies indicate that the presence of different variants in genes coding hormone receptors may be related to obesity and components of metabolic syndrome or may have protective effect. NGS methods was found to be very useful tool for whole gene study that helps to reveal many new defects that were not previously reported. There were also differences in reported variants between recently studied populations.

10. PIŚMIENICTWO

1. Abraham Sb, Rubino D, Sinaii N, et al. Cortisol, obesity, and the metabolic syndrome: a cross-sectional study of obese subjects and review of the literature. *Obesity* 2013; 21:
2. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120(16):1640–1645.
3. Ali S, Ahamad ST, Talpur AS, et al. Prevalence of Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus Among Patients with Cholelithiasis: A Single-centered, Cross-sectional Study. *Cureus* 2018 Apr 7;10(4):e2444.
4. Aguirre GA, Rodriquez De Ita J, De la Garza RG et all. Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrom. *J Transl Med* 2016, 14:3
5. Atgie C, D’Allaire F, Bukowiecki LJ. Role of beta1- and beta3-adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. *Am J Physiol* 1997 Oct;273(4):C1136-
6. Bajuk Studen K, Pfeifer M. Cardiometabolic risk in polycystic ovary syndrome. *Endoc Connect* 2018 Jul;7(7):R238-R251.
7. Barczyk A, Kutkowska-Kaźmierczak A, Castañeda J, et al. The genetics of obesity - pathogenetic, clinical and diagnostic aspects. *Dev Period Med* 2017;21(3):186-202.
8. Basile KJ, Johnson ME, Xia Q, Grant SF · Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: follow-up of findings from genome-wide association studies. *Int J Endocrinol* 2014;2014:769671.
9. Bergman A, Heindel JJ, Kasten T, et al. The impact of endocrine disruption: a consensus statement on the state of the science. *Environ Health Perspect* 2013;121:A104–A106
10. Bodhini D, Sandhiya M, Ghosh S, et al. Association of his1085His *INSR* gene polymorphism with diabetes type 2 in South Indians. *Diabet Technol Ther* 2012, 14:696-700

11. Bonnefond A, Raimondo A, Stutzmann F, Ghossaini M, Ramachandrapa S, et al. Loss-of-function mutations in SIM1 contribute to obesity and Prader-Willi-like features. *J Clin Invest* 2013 Jul;123(7):3037-41.
12. Borengasser SJ, Zhong Y, Kang P, et al. Maternal obesity enhances white adipose tissue differentiation and alters genome-scale DNA methylation in male rat offspring. *Endocrinology* 2013 Nov;154(11):4113-25.
13. Brooks RC, Simpson SJ, Raubenheimer D. The price of protein: combining evolutionary and economic analysis to understand excessive energy consumption. *Obes Rev* 2010 Dec;11(12):887-94.
14. Burge GC, Lillycrop KA, Phillipos ES, et al. Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition. *J Nutr* 2009 Jun;139(6):1054-60.
15. Catalano PM, Farrell K, Thomas A, et al. Perinatal risk factors for childhood obesity and metabolic dysregulation. *Am J Clin Nutr* 2009 Nov;90(5):1303-13.
16. Chaput JP, Perusse L, Despres JP, et al. Findings from the Quebec Family Study on the Etiology of Obesity: Genetics and Environmental Highlights. *Curr Obes Rep* 2014 Jan 4;3:54-66.
17. Carey DGP, Campell LV, Chisholm DJ. Is visceral fat (intraabdominal and hepatic) a major determinant of gender differences in insulin resistance and dyslipidemia?. *Diabetes* 1996;45:110A
18. Carey RM, Muntner P, Bosworth HB, et al. Prevention and Control of Hypertension: JACC Health Promotion Series. *J Am Coll Cardiol* 2018 Sep 11;72(11):1278-1293.
19. Chesi A, Grant SFA. The Genetics of Pediatric Obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2015 Dec;26(12):711-721.
20. Chinn D. Definitions of childhood obesity: current practice. *Eur J Clin Nutr* 2006 Oct;60(10):1189-94.

21. Church TS, Thomas DM, Tudor-Locke C, et al. Trends over 5 decades in U.S. occupation-related physical activity and their associations with obesity. *PLoS One* 2011;6(5):e19657.
- 22 .Cignarelli A, Perrini F, Nigro P at al. Long-acting insulin analogue detemir displays reduced effects on adipocyte differentiation of human subcutaneous and visceral adipose stem cell. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2016,26:33
- 23.Cignarelli A, Genchi VA, Perrini S et al. Insulin and insulin receptor in adipose tissue development. *Int J Mol Sci* 2019,20:75
24. Claussintzer M, Dankel SN, Kim SN, et al. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N Eng J Med* 2015 Sep 3;373(10):895-907.
25. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, et al. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000 May 6;320(7244):1240-.
26. Creemers JW, Choquet H, Stijnen P, et al. Heterozygous mutations causing partial prohormone convertase 1 deficiency contribute to human obesity. *Diabetes* 2012 Feb;61(2):383-90.
27. Cummings DE. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav* 2006;89:71–84
28. Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, et al. Activation of human brown tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab* 2015,21:33-38.
29. Dabalea D, Hanson RL, Lindsay RS, et al. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes* 2000 Dec;49(12):2208-11.
30. Day FR, Loos RJ. Developments in obesity genetics in the era of genome-wide association studies. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011;4(4):222-38.
31. Daniels SR, Jacobson SR, Jacobson MS et al. American Heart Association Childhood Obesity Research Summit: executive summary. *Circulation* 2009;119:2114-2123.

32. Davey RA, Grossmann M. Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside. *Clin Biochem Rev* 2016 Feb;37(1):3-15.
33. De Alencar SA, Lopes JCD. A comprehensive in silico analysis of the functional and structural impact of SNPs in the IFG1R gene. *J Biomed Biotech* 2010;2010:ID 715139
34. De Meyts P. The insulin receptor and its signal transduction network. In Endotext [internet] South Dartmouth (MA): *MDT Text.com, Inc* 2000-2016 Apr 27
35. Desai M, Beall M, Ross MG. Developmental origins of obesity: programmed adipogenesis. *Curr Diab Rep* 2013 Feb;13(1):27-33.
36. Dhurandhar NV, Bailey D, Thomas D. Interaction of obesity and infections. *Obes Rev* 2015 Dec;16(12):1017-29.
37. DiGirolamo M, Eden S, Enberg G et al. Specific binding of human growth hormone but not insulin-like growth factors by human adipocytes. *Febs Lett* 1986, 205:15-19.
38. Diez JJ, Iglesias P. Relationship between thyrotropin and body mass index in euthyroid subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2011 Mar;119(3):144-50.
39. Doo M, Kim Y. Association between ESR1 rs1884051 polymorphism and dietary total energy and plant protein intake on obesity in Korean men. *Nutr Res Pract* 2011 Dec;5(6):527-32
40. Drygas w, Niklas AA, Piwońska A et al. Multi-centre National Population Health Examination Survey (WOBASZ II study): assumptions, methods, and implementation. *Kardiol Pol* 2016;74(7):681-90.
41. Dubern B, Clement K. Leptin and leptin receptor-related monogenic obesity. *Biochimie* 2012 Oct;94(10):2111-5.
42. Eaton SA, Sethi JK. Immunometabolic link between estrogen, adipose tissue and female reproductive metabolism. *Biology (Basel)* 2019 Feb 7;8 (i).pii:E8.
43. Elahi D, McAloon-Dyke M, Fukagawa NK et al. Effects of recombinant human IGF-1 on glucose and leucine kinetics in men. *Am J Physiol* 1993, 265:E831-E838.

44. Even SE, Dulak-Lis MG, Touyz RM et al. Crosstalk between adipose tissue and blood vessels in cardiometabolic syndrom: implication of steroid hormone receptors (MR/GR). *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014 Aug;19(2):89-101.
45. Fairbrother U, Kidd E, Malagamuwa T et al. Genetics of severe obesity. *Curr Diab Rep* 2018, Aug 18;18(10):85
46. Farooqi IS. Genetic and hereditary aspects of childhood obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005 Sep;19(3):359-74.
- 47 Farooqi IS. Genetic, molecular and physiological mechanisms involved in human obesity: Society for Endocrinology Medal Lecture 2012. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015 Jan;82(1):23-8.
48. Farooqi IS, O’Rahilly S. Monogenic human obesity syndromes. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:409–424
49. Fernandes-Rosa FL, Bueno AC, De Souza RM et al. Mineralocorticoid receptor p.l180V polymorphism: association with body mass index and LDL-cholesterol levels. *J Endocrinol Invest* 2010 Jul-Aug;33(7):427-7.
50. Fernandez AM, Kim JK, Yakar S et al. Functional inactivation of the IGF-1 and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes . *Genes Dev* 2001, 15:1926-1934.
51. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, et al. Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). *Lancet* 2011 Feb 12;377(9765):557-67.
52. Flier JS. Clinical review 94: What’s in a name? In search of leptin’s physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1407–1413 .
53. Friedrich N, Thuesen B, Jorgensen T et al. the association between IGF-1 and insulin resistance. A general population study in Danish adult. *Diabetes Care* 2012, 35:768-773)
52. Fuller PJ, Novel interactions of the mineralocorticoid receptor . *Mol Cell Endocrinol* 2015 Jun 15;408:33-7.

53. Geller DA. Obsessive-compulsive and spectrum disorders in children and adolescents. *Psychiatr Clin North Am* 2006 Jun;29(2):353-70.
54. Garg R, Hurwitz S, Williams GH, Hopkins PN, Adler GK. Aldosterone production and insulin resistance in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metabol* 2010; 95: 1986– 1990.
55. Główny Urząd Statystyczny: Stan zdrowia ludności Polski w 2014 r., GUS, Warszawa 2016
<https://stat.gov.pl › zdrowie › stan-zdrowia-ludnosci-polski-w-2014-r->
56. Goodarzi MO. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018 Mar;6(3):223-236.
57. Goossens GH. The metabolic phenotype in obesity: fat mass, body fat distribution and adipose tissue function. *Obes Facts* 2017;10(3):207-215.
58. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, et al. EDC-2: the Endocrine Society's Second Scientific Statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev* 2015;36:E1–E150
59. Gu Y, Zheng L, Zhang Q et al. Relationship between thyroid function and elevated blood pressure in euthyroid adults. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2018 Oct;20(10):1541-1549.
60. Hassan NE, El-Masary SA, Zarouk W et al. Obesity phenotype in relation to gene polymorphism among samples of Egyptian children and their mothers. *Gene Dis* 2017, 18:15-157.
61. Haworth CM, Plomin R, Carnell S et al. Childhood obesity: genetic and environmental overlap with normal-range BMI . *Obesity (Silver Spring)* 2008 Jul;16(7):1585-90.
62. He H, Sun D, Zeng Y, et al A Systems Genetics Approach Identified GPD1L and its Molecular Mechanism for Obesity in Human Adipose Tissue. *Sci Rep* 2017 May 11;7(1):1799.
63. Herrera BM, Lindgren CM. The genetics of obesity. *Curr Diab Rep* 2010 Dec;10(6):498-505.
64. Heymsfield SB, Fong TM, Gantz I, Erond N. Fat and energy partitioning: longitudinal observations in leptin-treated adults homozygous for a Lep mutation. *Obesity (Silver Spring)* 2006 Feb;14(2):258-65.

65. Holder JL Jr, Butte NF, Zinn AR. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* 2000 Jan 1;9(1):101-8.
66. Jones MR, Brower MA, Xu N et al. System genetics reveals the functional context of PCO loci and identifies genetic and molecular mechanism of disease heterogeneity. *PloS Genet* 2015,11:e1005455.
67. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relations between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver diseases. *Int J Mol Sci* 2014 Apr 11;15(4):6184-223.
68. Katsarou MS, Karathanasopoulou A, Adrianopoulou A et al. Beta 1, Beta2 and Beta3 adrenergic receptor gene polymorphism in southeastern European Population. *Front Genet* 2018,9:560
69. Kim Jy, DeMenna JT, Puppala S et al. Physical activity and FTO genotype by physical activity interactive influences on obesity. *BMC Genet* 2016 Feb 24;17:47.
70. Kondo T, Ono K, Kitano S, et al. Mild electrical stimulation with heat shock reduced visceral adiposity and improves metabolic abnormalities in subject with metabolic syndrome or type 2 diabetes : randomized crossover trials. *Bio Medicine* 2014 Nov 11:1(1):80-9:
71. Krude H, Bidermann H, Luck W, et al. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutation in human. *Nat Genet* 1998 Jun;19(2):155-7.
72. Lardone MC, Castro A, Pereira A et al. Role of the androgen receptor gene CAG repeat polymorphism on the sequence of pubertal events and adiposity in girls with high Dehydroepiandrosterone sulfate Level. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2019 Jun;32(3):271-277.
73. Laviola L, Perrini S, Cignarelli A et al. Insulin signalling in human adipose tissue. *Arch Physiol Biochem* 2006,112,82-88.
74. Lee JH. Prevalence of hyperuricemia and its association with metabolic syndrome and cardiometabolic risk factors in Korean children and adolescents: analysis based on the 2016-2017 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Korean J Pediatr* 2019 Aug;62(8):317-323

75. Lee HR, Kim TH, Choi KC. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab Anim Res* 2012 Jun;28(2):71-6.
76. Legro R. Obesity and PCOS: implications for diagnosis and treatment. *Semin Reprod Med* 2012; 30: 496– 506.
77. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA *et al.* Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metabol* 2013; 98: 4565– 4592.
78. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005 Aug;19(8):1951-9.
79. Locke AE, Kahali B, Berndt SI *et al.* Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 2015 Feb 12;518(7538):197-206.
80. Lotta La, Mokrosiński J, Mendes de Oliveira E , *at al.* Human gain-of-function MC4R variants show signaling bias and protect against obesity. *Cell* 2019;17:597.
81. Lubrano-Berteliet C, Durand E, Dubern B, *et al.* Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations. *Hum Mol Genet* 2003 Jan 15;12(2):145-53.
82. Marzolla V, Armani A, Zennaro MC *et al.* The role of mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2012 Mar 24;350(2):281-8.
83. Mayr C. Protein complexes assemble as they are being made. *Nature* 2018 Sep;561(7722):186-187.
84. McCarthy M, Thomas C. PTH excess may promote weight gain by impeding catecholamine-induced lipolysis — implication for the impact of calcium, vitamin D and alcohol on body weight. *Med Hypotheses* 2003;61: 535–542
85. Macdonald K, Porter G, Guernsey DL *et al.* A polymorphic variant of the insulin-like growth factor I receptor gene modifies risk of obesity for oesophageal carcinoma. *Cancer Epidemiol* 2009;33:37-40.

86. Mennucci M. Endocrine changes in obesity. *Endotext* 2011: 1– 36.
87. Memisoglu A, Hu FB, Hankinson SE et al. Prospective study of the association between the proline to alanine codon 12 polymorphism in the PPAR gamma gene and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003 Oct;26(10):2915-7.
88. Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, et al. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism* 2013; 62: 457–478
89. Ministerstwo zdrowia: Raport Ministerstwa Zdrowia: program polityki zdrowotnej Ministra Zdrowia -Program Profilaktyki i Leczenia Chorób Układu Sercowo-Naczyniowego POLKARD na lata 2017-2020,2018 <https://www.gov.pl/web/zdrowie/program-profilaktyki-i-leczenia-chorob-ukladu-sercowo-naczyniowego-polgard-na-lata-2017-2020>
90. Min-Kyung S, Bangkun C, Eun-Young K et al. Elevated pentraxin 3 in obese adipose tissue promotes adipogenic differentiation by activating neuropeptide Y signaling. *Front Immunol* 2018; 9: 1790.
91. Mohlig M, Arafat AM, Osterhoff MA et al. Androgen receptor CAG repeat length polymorphism modifies the impact of testosterone on insulin sensitivity in men. *Eur J Endocrinol* 2011 Jun;164(6):1013-8. Mar 28.
92. Morales Camacho WJ, Molina Diaz JM, Plata Ortiz S, et al. Childhood obesity: aetiology, comorbidities, and treatment. *Diabetes Metab Rev* 2019 Jul 12:e3203. doi: 10.1002/dmrr.3203.
93. Niklas A, Foltyńska a, Puch-walczak A, et al. WOBASZ II investigators. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in the adult Polish population - Multi-center National Population Health Examination Surveys - WOBASZ studies. *Arch Med Sci* 2018 Aug;14(5):951-961.
94. Nilsson M, Dahlam I, Jiao H, et al. Impact of estrogen receptor gene polymorphisms and mRNA levels on obesity and lipolysis--a cohort study. *BMC Med. Genet* 2007 Dec 4;8:73.
95. Olivier G, Wardle J, Gibson EL. Stress and food choice: a laboratory study. *Psychosom Med* 2000 Nov-Dec;62(6):853-65

96. O’Rahilly S, Farooqi IS. Human obesity as a heritable disorder of the central control of energy balance. *Int J Obes* 2008;32(Suppl 7):S55–S61.
97. Orru S, Nigro E, Mandola A et al. A functional interplay between IGF-1 and adiponectin. *Int J Mol* 2017, 18:2145.
98. Palmisano BT, Zhu L, Stafford JM. Role of estrogens in the regulation of liver lipid metabolism. *Adv Exp Med. Biol* 2017;1043:227-256.
99. Parson TJ, Power C, Logan S et al. Childhood predictors of adult obesity: a systematic review. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999 Nov;23 Suppl 8:S1-107.
100. Pasquali R, Oriolo C. Obesity and Androgens in Women. *Front Horm Res* 2019;53:120-
101. Pausova Z, Abrahamowicz M, Mahboubi A et al. Variation in the androgen-receptor gene is associated with visceral adiposity and blood pressure in male adolescents. *Hypertension* 2010 Mar;55(3):706-14.
102. Plagemann A, Harder T, Brunn M, et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol* 2009 Oct 15;587(Pt 20):4963-76
103. Poddar, M. Chetty, Y. and Chetty, V. T. How does obesity affect the endocrine system? A narrative review. *Clin Obes* 2010, 7: 136-144.
104. Pujanek M. Pathomechanisms of the development of obesity in some endocrinopathies – an overview. *Endokrynol Pol* 2013; 64: 150– 155.
105. Rodriguez-Gonzalez G, Ramirez-MorenoR, Perez R, et al. The GGN and CAG repeat polymorphisms in the exon-1 of the androgen receptor gene are respectively, associated with insulin resistance in men and with dyslipidemia in women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009 Feb;113(3-5):202-8.
106. Rosenbaum M, Knight R, Leibel RL. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:493–501

107. Roth CL, Hinney A, Schur EA. Association analyses for dopamine receptor gene polymorphism and weight status in a longitudinal analysis in obese children before and after lifestyle intervention. *BMC Pediatr* 2013 Nov 27;13:197.
108. Sachon R, Gambinieri A, Alpanes M, et al. Prevalence of functional disorders of androgen excess in unselected premenopausal women: a study in blood donors. *Hum Reprod* 2012 Apr;27(4):1209-16.
109. Salans LB, Cushman SW, Weismann RE. Study of human adipose tissue, adipose size cell and number in nonobese and obese patient. *J Clin Invest* 1973 Apr;52(4):92
110. Saltiki K, Mantzou E, Doukas C, et al. Estrogen receptor beta gene variants may be associated with more favorable metabolic profile in postmenopausal women undergoing coronary angiography. *Exp.Clin Endocrinol Diabetes* 2009 Nov;117(10):610-5.
111. Sapilak BJ, Melon-Sapilak M, Hans-Wytrychowska A. Hormonalne aspekty zaburzeń odżywiania . *Terapia* 2017:tom 5, zeszyt 2:22-28.
112. Schwartz MW, Seeley RJ, Zeltser LM, et al. Obesity pathogenesis: an endocrine society scientific statement . *Endocr Rev* 2017 Aug 1;38(4):267-296.
113. Schousboe K, Willemsen G, Kyvik KO, et al. Sex differences in heritability of BMI: a comparative study of results from twin studies in eight countries. *Twin Res* 2003 Oct;6(5):409-21.
114. Sesti G, Federici M, Lauro D , et al. Molecular mechanism of insulin resistance in typ 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms. *Diabetes Metab Res Rev* 2001,17:363-373.
115. Siemińska L. Adipose tissue. Pathophysiology, distribution, sex differences and the role in inflammation and cancerogenesis. *Endokryol Pol* 2007 Jul-Aug;58(4):330-42
116. Silvetoinen K, Rokholm B, Kaprio J, et al. The genetic and environmental influences on childhood obesity: a systematic review of twin and adoption studies. *Int J Obes (Lond)* 2010 Jan;34(1):29-40.

117. Sharp GC, Lawor DA, Richmond RC ,et al. Maternal pre-pregnancy BMI and gestational weight gain, offspring DNA methylation and later offspring adiposity: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Int J Epidemiol* 2015 Aug;44(4):1288-304.
118. Shi H, Starder AD, Woods SC , et al. Sexually dimorphic responses to fat loss after caloric restriction or surgical lipectomy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*2007,293:E316-E326.
119. Shin MK, Choi B, Kim EY , et al. Elevated pantraxin 3 in obese adipose tissue promotes adipogenic differation by activation neuropeptide Y singnalising. *Front Immunol* 2018 Jul 30:9:1790
120. Skinner MK. Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Mol Cell Endocrinol* 2014;398:4–12
121. Skowrońska B, Fichna M., Fichna P. Rola tkanki tłuszczowej w układzie dokrewnym. *Endokrynol Otył Zab Przem Mat* 2005:1(3), 21-29
122. Sookoian S, Gianotti TF, Gemma C et al. Role of genetic variation in insulin-like growth factor 1 receptor on insulin resistance and arterial hypertension. *J.Hypertens* 2010,28:1194-1202.
123. Speakman JR. A nonadaptive scenario explaining the genetic predisposition to obesity: the "predation release" hypothesis. *Cell Metab* 2007 Jul;6 (1):5-12.
124. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, et al . Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 2010 Nov;42(11):937-48.
125. Stanwoth RD, Kapoor D, Channer KS, et al. Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with serum testosterone levels, obesity and serum leptin in men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2008 Dec;159(6):739-46.
126. Sun J, Wang Y, Zhang X et al. The effects of metformin on insulin resistance in overweight or obese children and adolescents: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimor)* 2019 Jan;98(4):e14249.
127. Tartaglia LA, Demski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995 Dec 29;83(7):1263-71.

128. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity : an update. *Physiol Rev* 2013,93:359-404.
129. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 2012 Jan;122(1):153-62.
130. Thomas DD, Corkey BE, Istfan NW et al. Hyperinsulinemia : an early indicator of metabolic dysfunction. *J.Endocr.Soc* 2019 Jul 24;3(9):1727-1747.
131. Tirabassi G, Ciganerlli A, Perrini S, et al. Influence of CAG repeat polymorphism on the target of testosterone action. *Int J Endocrinol* 2015:2015:298107.
132. Trandafir LM, Temneanu OR. Pre and post-natal risk and determination of factors for child obesity. *J Med Life* 2016 Oct-Dec;9(4):386-391.
133. Turnbaugh PJ. Microbes and diet-induced obesity: fast, cheap and out of control. *Cell Host Microbe* 2017 Mar 8;21(3):278-281.
134. Ullrich A, Gray A, Tam A, et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 1986 : 5:2503-2512.
135. Ullrich A, Bell JR, Chen EY, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*. 1985; 313:756-761
136. Valdearcos M, Robble MM, Benjamin DI, et al. Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function. *Cell Rep* 2014 Dec 24;9(6):2124-38.
137. Valette M, Bellisle F, Carette C, et al. Eating behavior in obese patient with melanocortin-4 receptor mutations: a literature review. *Int J Obes (Lond)* 2013 Aug;37(8):1027-35.
138. Vecchiola A, Alagos CF, Carvajal CA, et al. Aldosterone production and signaling dysregulation in obesity. *Curr Hypertens Rep* 2016 Mar 18: 18(3):20

139. Veiga-Lopez A, Pu Y, Gingrich J, et al. Obesogenic Endocrine Disrupting Chemicals: Identifying Knowledge Gaps. *Trends Endocrinol Metab* 2018 Sep;29(9):607-625.
140. Verkouter I, Noordam R, Le Cessie S, et al. The association between adult weight gain and insulin resistance at middle age: mediation by visceral fat and liver fat. *J Clin Med* 2019 Sep 28;8(10). pii E1559.
141. Villa J, Pratley RE: Adipose tissue dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Curr Diab Rep* 2011;11:179-184.
142. Wake DJ, Strand M, Rask E , et al. Intra-adipose sex steroid metabolism and body fat distribution in idiopathic human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:440-446.
143. Wang CH, Lin WD, Bau DT et al. The involvement of insulin receptor genotypes in pre- and coobese acanthosis Nigricans children and adolescent. *J.Pediatr Endocrinol Metab* 2010, 23:653-660.
144. WHO. Global Database on child growth and malnutrition global strategy on diet, physical activity and health, www.who.int/ 08.2019
145. WHO, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complication: report of WHO consultation, Geneva Switzerland : *World Health Organization* 1999; <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66040>.
146. Wolters B, Lass N, Reinehr T. TSH and free triiodothyronine concentrations are associated with weight loss in a lifestyle intervention and weight regain afterwards in obese children. *Eur J Endocrinol* 2013;168:323–329.
147. Xia Q, Grans SF. The genetics of human obesity. *Ann NY Acad Sci* 2013, Apr:1281:178-90.
148. Yang J, Han R, Chen M et al. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome : a systemic review and meta - analysis. *Horm Metab Res* 2018 Jun:50(6):469-477.

149. Yau YH, Potenza MN. Stress and eating behaviour. *Minerva Endocrinol* 2013 Sep;38(3):255-67.
150. Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S , et al. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 1998 Oct;20(2):111-2.
151. Yeo GS. The role of the FTO (Fat Mass and Obesity Related) locus in regulating body size and composition. *Mol. Cell Endocrinol* 2014 Nov;397(1-2):34-41.
152. Zdrojewski T, Rutkowski M, Bandosz M, et al. Prevalence and control of cardiovascular risk factors in Poland. Assumptions and objectives of the NATPOL 2011 Survey. *Kardiol Pol* 2013;71(4):381-92.
153. Zhang Y, Klein K, Sugathan A , et al. Transcriptional profiling of human liver identifies sex-biased gene associated with polygenic dyslipidemia and coronary artery disease. *PLoS One* 2011;6(8):e23506.

11. SPIS TABEL

Tabela nr 1 : Przyczyny hormonalne otyłości

Tabela nr 2 : Adipokiny i ich funkcje

Tabela nr 3 : Dane demograficzne i antropometryczne analizowanych grup kobiet

Tabela nr 4 : Zakres norm i metody oznaczeń biochemicznych wykorzystanych do korelacji kliniczno-genetycznych.

Tabela nr 5 : Zakres norm i metody oznaczeń hormonalnych

Tabela nr 6 : Zestawienie analizowanych genów receptorów .

Tabela nr 7 : Wskaźniki HOMA-IR i WHTR w obu grupach kobiet

Tabela nr 8 : Wartości badanych parametrów gospodarki lipidowej w obu grupach.

Tabela nr 9 : Wartości stężenia glukozy w 0 i 120 min testu obciążenia 75 g glukozy poddane analizie w obu grupach.

Tabela nr 10 : Wartości stężenia insuliny w 0 i 120 min testu obciążenia 75 g glukozy poddane analizie w obu grupach.

Tabela nr 11 : Kryteria rozpoznawania zespołu metabolicznego (2009)

Tabela nr 12 : Występowanie wykrytych polimorfizmów (SNP) genu *ESR1* u chorych z otyłością oraz w grupie kontrolnej - (A) – allele; (B i C) – genotypy (kalkulacja odpowiednio dla modelu dominującego i recesywnego)

Tabela nr 13 : Korelacje kliniczne dla polimorfizmów genu *ESR1* (A,B,C)

Tabela nr 14 : Występowanie wykrytych polimorfizmów genu *ESR2* u chorych z otyłością oraz w grupie kontrolnej - (A) – allele; (B i C) – genotypy (kalkulacja odpowiednio dla modelu dominującego i recesywnego)

Tabela nr 15 : Występowanie wykrytych polimorfizmów genu *AR* u chorych z otyłością oraz w grupie kontrolnej - (A) – allele; (B i C) – genotypy (kalkulacja odpowiednio dla modelu dominującego i recesywnego)

Tabela nr 16 : Korelacje kliniczne dla polimorfizmów genu *AR* (A,B,C)

Tabela nr 17 : Występowanie wykrytych polimorfizmów genu *ADRB3* u chorych z otyłością oraz w grupie kontrolnej - (A) – allele; (B i C) – genotypy (kalkulacja odpowiednio dla modelu dominującego i recesywnego)

Tabela nr 18 : Korelacje kliniczne dla polimorfizmów genu *ADRB3* (A,B,C)

Tabela nr 19 : Występowanie wykrytych polimorfizmów genu *INSR* u chorych z otyłością oraz w grupie kontrolnej - (A) – allele; (B i C) – genotypy (kalkulacja odpowiednio dla modelu dominującego i recesywnego)

Tabela nr 20 : Częstość występowania analizowanych haplotypów dla genu *INSR*

Tabela nr 21 : Analiza istotności statystycznej haplotypów dla genu *INSR*

Tabela nr 22 : Korelacje kliniczne dla polimorfizmów *INSR* (A,B,C)

Tabela nr 23 : Występowanie wykrytych polimorfizmów genu *IGF1R* u chorych z otyłością oraz w grupie kontrolnej - (A) – allele; (B i C) – genotypy (kalkulacja odpowiednio dla modelu dominującego i recesywnego).

Tabela nr 24 : Częstość występowania analizowanych haplotypów genu *IGF1R*

Tabela nr 25 : Analiza istotności statystycznej haplotypów dla genu *IGF1R*

Tabela nr 26 : Korelacje danych klinicznych dla polimorfizmów genu *IGFR1* (A,B,C)

Tabela nr 27 : Polimorfizmy badanych genów wykazujące istotność statystyczną ($p < 0,5$)

Tabela nr 28 : Polimorfizmy dla *IGF1R* wykazujące istotność statystyczną ($p < 0,5$)

Tabela nr 29 : Polimorfizmy badanych genów w korelacji z cechami klinicznymi w badanej grupie.

12. SPIS RYCIN

Rycina nr 1: Schemat mechanizmów neurohormonalnych kontroli przyjmowania pokarmów

Rycina nr 2: Etapy kwalifikacji do badań

Rycina nr 3: Zaburzenia gospodarki lipidowej w grupie kobiet z otyłością

Rycina nr 4 : Zaburzenia gospodarki węglowodanowej w grupie badanej

Rycina nr 5: Choroby występujące w grupie z otyłością.

Rycina nr 6 : Schemat genu *ESR1*

Rycina nr 7 : Schemat genu *ESR2*

Rycina nr 8 : Schemat genu *AR*

Rycina nr 9 : Schemat genu *NR3C2*

Rycina nr 10 : Schemat genu *ADRB3*

Rycina nr 11 :Schemat genu *MC4R*

Rycina nr 12 : Schemat genu *INSR*

Rycina nr 13: Analizowane haplotypy genu *INSR*

Rycina nr.14: Schemat genu *IGF1R*

Rycina nr. 15: Analizowane haplotypy genu *IGF1R*

Rycina nr 16: Schemat miejsc wiązania mRNA w obrębie 3'UTR genu *IGF1R*

Rycina nr 17: Schemat miejsc wiązania mRNA w obrębie 3'UTR genu *INSR*

13. ZAŁĄCZNIKI:

Załącznik nr 1 : Wykryte polimorfizmy genu *ESR1*

Załącznik nr 2 : Wykryte polimorfizmy genu *ESR2*

Załącznik nr 3 : Wykryte polimorfizmy genu *AR*

Załącznik nr 4 : Wykryte polimorfizmy genu *NR3C2*

Załącznik nr 5 : Wykryte polimorfizmy genu *ADRB3*

Załącznik nr 6 : Wykryte polimorfizmy genu *MC4R*

Załącznik nr 7 : Wykryte polimorfizmy genu *INSR*

Załącznik nr 8 : Wykryte polimorfizmy genu *IGF1R*

Załącznik nr 9 : Linki do stron internetowych

Załącznik nr.10 : Zgoda komisji bioetycznej

13. ZAŁĄCZNIKI

Zestawienie wszystkich wykrytych wariantów z częstością $MAF < 0,1$. W tabelach uwzględniono warianty istotne statystycznie- zostały zaznaczone czerwoną czcionką.

Załącznik nr 1: Wykryte warianty *ESR1*

Lp.	Wariant / numer rs	Pozycja genomowa na chr. 6, hg19	Rodzaj defektu	Patogenność wg Mutation Taster	Nukleotydy/y referencyjny	Zmiana	Efekt
1	brak	152129308	DEL-INS- p.A88Rfs*21	DCA	GG	G	Frameshift, PROT- F,NMD
2	142712646	152265352	SBE-p.R269C	DC	C	T	PROT-F
3	brak	152129406	SBE-p.F120S	DC	T	C	PROT-F
4	brak	152265522	DEL- p.I326Yfs*17	DCA	G	0	Frame shift, PROT- F,NMD
5	9397459	152265659	SBE	POL-A	G	A	SPL-PROT F
6	55716045	152332744	SBE	POL	G	A	SPL-PROT F
7	brak	152163807	SBE-p.M176I	DC	G	C	SPL

Rodzaje defektów: DEL- delecja, INS- insercja, DEL-INS- usunięcie i wstawienie, SBE- pojedyncza zmiana nukleotydu. **Rodzaje efektów:** SPL-PROT F – zaburzenie *splicingu* skutkujące zmianą funkcji białka, NMD- degradacja mRNA zawierającego nieprawidłowy przedwczesny kodon stop, SPL-zaburzenie *splicingu*, *Frame shift*- zmiana ramki odczytu. **Patogenność:** DC- wariant powodujący chorobę, DCA- automatyczny wariant powodujący chorobę (wariant o udokumentowanej patogenności), POL- polimorfizm predykcja funkcjonalna, POL-A polimorfizm predykcja automatyczna na podstawie wysokiej częstości w populacji ($MAF < 0,1$),

Załącznik nr 2: Wykryte warianty genu receptora *ESR2*

Lp.	Wariant / numer rs	Pozycja genomowa chr. 14, hg19	Rodzaj defektu	Patogenność wg Mutation Taster	Nukleotyd/y referencyjny	Zmiana	Efekt
1	28440970 (ochronny)	64694158	SBE	POL	T	C	SPL- PROT F
2	60101369	64701771	SBE	DC	A	G	SPL- PROT F
3	brak	64701807	SBE	DC	C	T	SPL- PROT F
4	142544449	64701807	SBE- p.R424W	DC	G	A	SPL- PROT F
5	brak	64716221	SBE	POL	A	G	SPL
6	brak	64727194	SBE- p.M309V	DC	A	C	SPL- PROT F
7	547381222	64727387	DEL	DC	CTTGCCGGCACAGTGCAGCT G	0	SPL- PROT F
8	74808355	64735532	SBE	DC	T	C	SPL- PROT F

Rodzaje defektów: DEL- delecja, INS- insercja, DEL-INS- usunięcie i wstawienie, SBE- pojedyncza zmiana nukleotydu. **Rodzaje efektów:** SPL-PROT F – zaburzenie *splicingu* skutkujące zmianą funkcji białka, NMD- degradacja mRNA zawierającego nieprawidłowy przedwczesny kodon stop, SPL-zaburzenie *splicingu*, *Frame shift*- zmiana ramki odczytu, SPL- zaburzenie *splicingu*. **Patogenność:** DC- wariant powodujący chorobę, DCA- automatyczny wariant powodujący chorobę (wariant o udokumentowanej patogenności), POL- polimorfizm predykcyjny funkcjonalny, POL-A polimorfizm predykcyjny automatyczny na podstawie wysokiej częstości w populacji (MAF<0,1),

Załącznik nr 3: Wykryte warianty genu *AR*

Lp.	Wariant / numer rs	Pozycja genomowa chr. X, hg19	Rodzaj defektu	Patogenność wg Mutation Taster	Nukleotydy referencyjne	Zmiana	Efekt
1	189146053	66764782	SBE	POL	C	A	SPL-PROT F
2	brak	66765159	DEL-Q58/59/60/61/62/63	POL	(GCA) ₆	0	PROT F
3	brak	66765213	DEL-Q58/59/60/61/62	POL	(GCA) ₅	0	SPL-PROT F
4	brak	66765219	DEL-Q58/59/60	POL	(GCA) ₃	0	SPL-PROT F
5	brak	66765237	DEL-p.R85Gfs*90	DCA	C	0	Frame shift,SPL-PROT F,NMD
6	150226204	66765624	SBE	POL-A	G	A	0
7	brak	66766348	DEL-INS-p.G455Vfs*24	DCA	(GT) ₅	4xGT	Frame shift,PROT F,NMD
8	brak	66766355	SBE-p.G456A	POL	G	C	SPL-PROT F
9	brak	66766357	DEL	POL	(GGC) ₁₃	0	SPL-PROT F
10	brak	66863176	SBE	DC	T	C	SPL-PROT F
11	brak (ochronny)	66931222	SBE	POL	A	G	SPL-PROT F
12	137852591	66941751	SBE-p.Q799E	POL-A	C	G	PROT F
13	5031002	66942625	SBE	POL-A	G	A	SPL-PROT F
14	brak	66943830	SBE	POL	T	C	0
15	brak	66945364	SBE	POL	A	C	SPL
16	brak	66945414	SBE	POL	G	T	SPL
17	brak	66945743	SBE	POL	A	G	SPL
18	brak	66945908	SBE	POL	C	T	0
19	brak	66946161	SBE	DC	A	G	SPL
20	182880285	66946904	SBE	POL	A	C	SPL
21	brak	66947091	SBE	DC	A	G	SPL
22	182063289	66947144	SBE	DC	T	C	SPL

23	brak	66947928	DEL	DC	G	O	SPL
24	brak	66948765	SBE	POL	C	T	SPL
25	brak	66949292	SBE	POL	A	G	SPL
26	brak	66949821	INS	POL	O	A	SPL
27	1282212747	66949830	SBE	POL	A	T	SPL
28	brak	66949841	SBE	POL	T	A	SPL- POL(A)
29	brak	66950023	DEL-INS	POL	AAG	A	SPL

Rodzaje defektów: DEL- delecja, INS- insercja, DEL-INS- usunięcie i wstawienie, SBE- pojedyncza zmiana nukleotydu. **Rodzaje efektów:** SPL-PROT F – zaburzenie *splicingu* skutkujące zmianą funkcji białka, NMD- degradacja mRNA zawierającego nieprawidłowy przedwczesny kodon stop, SPL-zaburzenie *splicingu*, *Frame shift*- zmiana ramki odczytu, SPL- zaburzenie *splicingu*. **Patogenność:** DC- wariant powodujący chorobę, DCA- automatyczny wariant powodujący chorobę (wariant o udokumentowanej patogenności), POL- polimorfizm predykcja funkcjonalna, POL-A polimorfizm predykcja automatyczna na podstawie wysokiej częstości w populacji (MAF<0,1),

Załącznik nr 4: Wykryte warianty genu *NR3C2*

Lp.	Wariant / numer rs	Pozycja genomowa chr. 4, hg19	Rodzaj defektu	Patogenność wg Mutation Taster	Nukleotyd/y referencyjny	Zmiana	Efekt
1	72647600	149000430	SBE	DC	T	G	SPL
2	brak	149000959	SBE	POL	C	A	SPL
3	brak	149002016	DEL-INS	DC	ATT	AT	SPL
4	brak	149002016	DEL-INS	DC	ATT	TTA	SPL
5	397779293	149002017	DEL	POL-A	T	O	SPL
6	brak	149002017	DEL-INS	DC	TT	T	SPL
7	5530	149002409	SBE	POL	A	G	SPL
8	61763143	149002667	SBE	POL	G	C	SPL- PROT F
9	brak	149002667	INS	POL	O	C	SPL- PROT F
10	brak	149041391	SBE- p.H857Q	POL	G	C	SPL- PROT F
11	72648713	149041480	SBE	POL	C	T	O
12	brak	149041500	SBE	POL	A	A	SPL- PROT F
13	62332227	149075500	SBE	POL-A	C	A	SPL- PROT F
14	5528	149356324	SBE	DC	G	A	O
15	brak	149357304	SBE- p.C237R	DC	A	G	PROT F
16	brak	149358060	SBE	POL	T	C	SPL- PROT F
17	brak	149363613	SBE	POL	G	A	SPL- PROT F

Rodzaje defektów: DEL- delecja, INS- insercja, DEL-INS- usunięcie i wstawienie, SBE- pojedyncza zmiana nukleotydu. **Rodzaje efektów:** SPL-PROT F – zaburzenie *splicingu* skutkujące zmianą funkcji białka, NMD- degradacja mRNA zawierającego nieprawidłowy przedwczesny kodon stop, SPL-zaburzenie *splicingu*, *Frame shift*- zmiana ramki odczytu, SPL- zaburzenie *splicingu*. **Patogenność:** DC- wariant powodujący chorobę, DCA- automatyczny wariant powodujący chorobę (wariant o udokumentowanej patogenności), POL- polimorfizm predykcyjny funkcjonalny, POL-A polimorfizm predykcyjny automatyczny na podstawie wysokiej częstości w populacji (MAF<0,1),

Załącznik nr 5: Wykryte warianty genu *ADRB3*

Lp	Wariant / numer rs	Pozycja genomowa chr. 8, hg19	Rodzaj defektu	Patogenność wg Mutation Taster	Nukleotyd/y referencyjny	Zmiana	Efekt
1	200867939	37820645	SBE	POL	C	T	SPL
2	544651920, 747043938, multiple alleles del(AC)3 / delACAC / delAC / dupAC / dupACAC / dup(AC)3	37820675	INS	POL	0	AC	SPL
3	brak	37820676	DEL	POL	AC	0	SPL
4	201029362	37820695	SBE	POL	A	G	SPL
5	201621845	37820697	SBE	POL	G	A	SPL
6	3990401	37820698	DEL	POL	CT	0	SPL
7	3990401, del(AC)3 / delACAC / delAC / dupAC / dupACAC	37820699	SBE	POL	A	G	SPL
8	brak	37820715	DEL	POL	AC	0	SPL
9	brak	37820740	INS	POL	0	G	SPL
10	brak	37820748	INS	POL	0	C	SPL
11	201336220	37821146	SBE	POL	G	A	SPL
12	brak	37823041	SBE-p.A316G	POL	G	C	SPL-PROT F
13	brak	37823927	DEL-p.A21Rfs*19	DCA	C	0	Frameshift , SPL-PROT F, NMD

Rodzaje defektów: DEL- delecja, INS- insercja, DEL-INS- usunięcie i wstawienie, SBE- pojedyncza zmiana nukleotydu. **Rodzaje efektów:** SPL-PROT F – zaburzenie *splicingu* skutkujące zmianą funkcji białka, NMD- degradacja mRNA zawierającego nieprawidłowy przedwczesny kodon stop, SPL-zaburzenie *splicingu*, *Frame shift*- zmiana ramki odczytu, SPL- zaburzenie *splicingu*. **Patogenność:** DC- wariant powodujący chorobę, DCA- automatyczny wariant powodujący chorobę (wariant o udokumentowanej patogenności), POL- polimorfizm predykcyjny funkcjonalny, POL-A polimorfizm predykcyjny automatyczny na podstawie wysokiej częstości w populacji (MAF<0,1),

Załącznik nr 6: Wykryte warianty genu receptora *MC4R*

Lp.	Wariant / numer rs	Pozycja genomowa chr. 18, hg19	Rodzaj defektu	Patogenność wg Mutation Taster	Nukleotyd/y referencyjny	Zmiana	Efekt
1	52820871	58038832	SBE-p.I251L	DC	T	G	SPL-PROT F
2	13447331	58039203	SBE-p.S127L)	DCA	G	A	SPL-PROT F
3	13447329	58039248	SBE-p.T112M	POL	G	A	SPL-PROT F
4	2229616	58039276	SBE-p.V103I	DC	C	T	PROT-F
5	brak	58039604	SBE	POL	T	A	0

Rodzaje defektów: DEL- delecja, INS- insercja, DEL-INS- usunięcie i wstawienie, SBE- pojedyncza zmiana nukleotydu. **Rodzaje efektów:** SPL-PROT F – zaburzenie *splicingu* skutkujące zmianą funkcji białka, NMD- degradacja mRNA zawierającego nieprawidłowy przedwczesny kodon stop, SPL-zaburzenie *splicingu*, *Frame shift*- zmiana ramki odczytu, SPL- zaburzenie *splicingu*. **Patogenność:** DC- wariant powodujący chorobę, DCA- automatyczny wariant powodujący chorobę (wariant o udokumentowanej patogenności), POL- polimorfizm predykcyjny funkcjonalny, POL-A polimorfizm predykcyjny automatyczny na podstawie wysokiej częstości w populacji (MAF<0,1),

Załącznik nr 7: Wykryte warianty genu *INSR*

Lp.	Wariant / numer rs	Pozycja genomowa chr. 19, hg19	Rodzaj defektu	Patogenność wg Mutation Taster	Nukleotyd/y referencyjny	Zmiana	Efekt
1	148930499	4115092	DEL	POL-A	AT	0	SPL
2	brak	4116570	SBE	POL	A	C	0
3	1799815	4125519	SBE	POL-A	G	A	SPL- PROT F
4	brak	7112432	SBE	POL	T	G	SPL
5	brak	7112862	SBE	POL	A	C	SPL
6	77859571	7113444	SBE	POL-A	T	C	SPL
7	116953519	7113526	SBE	POL	G	A	SPL
8	brak	7113656	SBE	POL	T	C	SPL
9	184243377	7113769	SBE	POL	G	A	SPL
10	72988602	7114038	SBE	POL	A	G	0
11	139376149	7114247	SBE	POL	C	T	SPL
12	brak	7114499	SBE	POL	C	T	SPL
13	181555180	7114603	SBE	POL	G	A	0
14	139376149	7114727	SBE	DC	T	C	SPL
15	80330850	7114749	SBE	POL	C	T	SPL
16	148930499	7115092	DEL	POL-A	AT	0	SPL
17	186013503	7115150	SBE	POL	C	G	SPL
18	brak	7115236	SBE	POL	G	T	SPL
19	41307635	7115453	SBE	POL	C	T	SPL
20	111557734	7115635	SBE	POL	G	A	SPL
21	374122178	7115872	SBE	DC	G	A	SPL
22	188386673	7115896	SBE	POL	G	A	SPL
23	brak	7116142	INS	POL	0	CTT	SPL

24	brak	7116283	DEL	POL	G	0	SPL
25	brak	7116300	SBE	POL	AAG	G	SPL
26	brak	7116300	SBE	POL	A	G	SPL
27	brak	7116545	SBE	DC	C	A	SPL
28	562228680	7116566	SBE	POL	A	C	0
29	rs72988602	7116570	SBE	POL	A	C	0
30	brak	7116779	DEL-INS	POL	GG	G	SPL
31	brak	7119600	SBBE	POL	G	A	0
32	148813626	7123031	SBE	POL	G	A	0
33	1799816	7125518	SBE- p.V1012 M	DCA	C	T	PROT F
34	brak	7132317	SBE	DC	G	A	SPL- PROT F
35	2229432	7141727	SBE	DC	G	A	SPL- PROT F
36	16994200	7141871	SBE	POL	G	C	0
37	13306451	7142824	SBE	DC	T	C	SPL- PROT F
38	2229430	7142843	SBE	DC	C	G	0
39	brak	7142931	SBE- p.R813Q	DC	C	T	SPL- PROT F
40	78433961	7142981	SBE- p.R784S	POL	C	G	SPL- PROT F
41	144197517	7150438	SBE	POL	G	A	SPL- PROT F
42	143523271	7150532	SBE- p.S748L	POL	G	A	0
43	6413501	7152775	SBE	DC	C	T	SPL- PROT F
44	brak	7166218	SBE- p.R603H	DC	C	T	SPL- PROT F
45	2245143	7168213	SBE	POL-A	C	T	0
46	76262811	7172366	SBE	DC	G	A	SPL- PROT F
47	brak	7184238	SBE	POL	G	A	SPL- PROT F
48	brak	7184576	SBE	POL	T	C	PROT F

			p.N242S				
49	brak	7184654	SBE	POL	G	C	SPL- PROT F
50	brak	7184669	SBE	POL	A	G	SPL- PROT F
51	brak	7184670	SBE	POL	G	A	SPL- PROT F
52	brak	7184671	SBE	POL	AGG	0	SPL- PROT F
53	brak	7184671	SBE	POL	AGG	AAG	SPL- PROT F
54	573453206	7184671	DEL	POL	A	G	SPL- PROT F
55	brak	7184671	DEL-INS	POL	AGG	AGAAG	SPL- PROT F
56	brak	7184672	SBE	POL	G	A	SPL- PROT F
57	brak	7184672	DEL-INS	POL	GGG	GGG(AT) ₃	0
58	brak	7184673	INS	POL	0	AA	SPL- PROT F
59	57380348	7184675	INS	POL-A	0	AAAT	0
60	145884847	7267747	SBE	DC	G	A	SPL- PROT F
61	41352749	7267783	SBE	DC	G	A	0
62	brak	7293697	SPL- PROT F	POL	C	T	SPL- PROT F
63	brak	7293754	SPL- PROT F	POL	C	G	SPL- PROT F

Rodzaje defektów: DEL- delecja, INS- insercja, DEL-INS- usunięcie i wstawienie, SBE- pojedyncza zmiana nukleotydu. **Rodzaje efektów:** SPL-PROT F – zaburzenie *splicingu* skutkujące zmianą funkcji białka, NMD- degradacja mRNA zawierającego nieprawidłowy przedwczesny kodon stop, SPL-zaburzenie *splicingu*, *Frame shift*- zmiana ramki odczytu, SPL- zaburzenie *splicingu*. **Patogenność:** DC- wariant powodujący chorobę, DCA- automatyczny wariant powodujący chorobę (wariant o udokumentowanej patogenności), POL- polimorfizm predykcyjny funkcjonalny, POL-A polimorfizm predykcyjny automatyczny na podstawie wysokiej częstości w populacji (MAF<0,1),

Załącznik nr 8: Wykryte warianty genu *IGF1R*

Lp	Wariant / numer rs	Pozycja genomowa chr. 14, hg19	Rodzaj defektu	Patogenność wg Mutation Taster	Nukleotyd/y referencyjny	Zmiana	Efekt
1	58523117	99503200	DEL	POL-A	GT	0	SPL
2	brak	99192745	INS	POL	0	T	0
3	369532761	99192746	DEL	POL	(TC) ₃	0	SPL-PROT F
4	140815976	99192754	SBE	POL	C	T	0
5	brak	99192756	SBE	POL	T	C	0
6	brak	99192759	SBE	POL	T	G	0
7	brak	99192760	SBE	POL	T	G	0
8	brak	99192767	SBE	POL	T	C	0
9	brak	99192767	SBE	DC	T	G	0
10	768733704	99192768	SBE	DC	T	G	0
11	brak	99192769	SBE	DC	T	G	0
12	brak	99192774	SBE	DC	T	G	0
13	55770488	99250921	SBE	DC	C	T	SPL-PROT F
14	brak	99434460	SBE	POL	A	G	0
15	200261849	99434540	SBE	POL	C	T	SPL-PROT F
16	2229764	99434816	SBE	POL-A	C	A	SPL-PROT F
17	brak	99439981	INS	POL	0	T	SPL-PROT F
18	brak	99440211	SBE	POL	C	T	0
19	brak	99442774	SBE-p.R391C	DC	C	T	SPL-PROT F
20	55895813	99442853	SBE	DC	A	G	0
21	17847198	99442891	SBE	POL	A	C	SPL-PROT F
22	45623742	99451667	SBE	POL	G	A	SPL-PROT F
23	45602637	99451680	SBE	POL	G	A	SPL-PROT F
24	150828367	99451713	SBE	DC	A	G	SPL-PROT F
25	34516635	99451976	SBE-p.R437H	DC	G	A	0

26	34313885	99452143	SBE	POL	C	G	SPL-PROT F
27	144795260	99454523	SBE	POL	C	T	SPL-PROT F
28	377404946	99454554	SBE	DC	C	T	0
29	33958176	99454613	SBESBE- p.R511Q	DC	G	A	SPL-PROT F
30	2228531	99456369	SBE	POL	G	A	SPL-PROT F
31	brak	99456522	SBE	POL	C	T	0
32	45506098	99459278	SBE	DC	C	T	SPL-PROT F
33	56294552	99459314	SBE	DC	G	T	SPL-PROT F
34	375617925	99459981	SBE- p.G693S	DC	G	A	SPL-PROT F
35	17847206	99467020	SBE	POL	G	T	0
36	56400113	99467831	SBE	DC	C	T	SPL-PROT F
37	201300318	99467939	SBE	POL	C	T	SPL-PROT F
38	brak	99467943	DEL-INS	POL	GTA	A	SPL-PROT F
39	brak	99473581	SBE	POL	T	C	SPL-PROT F
40	558244662	99478719	DEL	POL	CC	0	SPL-PROT F
41	brak	99491716	SBE	POL	C	T	SPL-PROT F
42	151264958	99491772	SBE	POL	C	A	SPL-PROT F
43	745660795	99491786	DEL	DC	T	0	SPL-PROT F
44	182933933	99491981	SBE	POL	T	G	SPL-PROT F
45	41468450	99500204	SBE	POL	G	A	SPL-PROT F
46	brak	99500222	SBE	POL	G	A	SPL-PROT F
47	brak	99500408	SBE- p.Y1280 H	DC	T	C	SPL-PROT F
48	70958400	99500542	SBE	DC	C	T	0
49	56403719	99500714	SBE	POL	G	A	SPL
50	brak	99500727	SBE	POL	G	A	SPL
51	45480091	99500728	SBE	POL	G	C	SPL
52	55945252	99500805	SBE	POL	C	T	0

53	brak	99500891	SBE	DC	C	T	SPL
54	558809166	99500962	SBE	POL	C	A	SPL
55	brak	99501245	SBE	DC	C	T	0
56	brak	99501316	SBE	DC	G	A	SPL
57	brak	99501713	SBE	DC	C	T	SPL
58	brak	99502242	SBE	POL	C	T	SPL
59	397836918	99502424	INS	DC	0	AT	SPL
60	139984519	99502494	SBE	POL	C	T	SPL
61	34530803	99502556	SBE	POL	G	C	SPL
62	534336774	99502568	SBE	POL	G	A	0
63	brak	99502582	SBE	POL	C	T	SPL
64	brak	99502592	SBE	POL	C	G	0
65	79862306	99502883	SBE	DC	G	A	SPL
66	brak	99503075	INS	POL	0	C	SPL
67	nowy del TAAA, najbliżej jest rs1434149464 i rs398028512,	99503083	DEL	POL	TAAA	0	SPL
68	brak	99503083	DEL	POL	TAA	0	SPL
69	brak	99503087	INS	POL	0	CT	SPL
70	brak	99503110	DEL	DC	AGG	0	SPL
71	brak	99503197	DEL	0	GGG(TG) ₆ TA(TG) ₃	0	SPL
42	58523117	99503200	DEL	POL-A	GT	0	SPL
73	brak	99503279	DEL	DC	CAAA	0	SPL
74	116869031	99503461	SBE	POL	C	T	SPL
75	397836919	99503522	INS	POL-A	0	TT	SPL
76	brak	99503526	DEL	POL	TTTG	0	SPL
77	563331348	99503868	SBE	POL	G	A	SPL
78	35121870	99504071	DEL	POL	AG	0	SPL

79	3833014	99504135	INS	POL-A	0	C	SPL
80	brak	99504255	SBE	POL	C	T	SPL
81	376818701	99504288	SBE	POL	G	A	SPL
82	brak	99504654	SBE	POL	G	A	SPL
83	117249222	99504902	SBE	POL	G	A	SPL
84	143593034	99505022	SBE	POL	A	G	SPL
85	547247976	99505063	SBE	POL	G	A	SPL
86	553558742	99505116	SBE	POL	C	T	0
87	brak	99505140	DEL	DC	T	0	SPL
88	144947320	99505270	SBE	DC	C	T	SPL
89	brak	99505425	SBE	POL	G	T	SPL
90	564308394	99505651	SBE	POL	G	A	SPL
91	185728238	99505673	SBE	POL	T	C	SPL
92	28393861	99505822	SBE	POL	T	C	SPL
93	28674628	99505828	SBE	POL	A	G	0
94	brak	99505990	SBE	POL	C	T	0
95	141739977	99506008	SBE	POL	C	T	0
96	111563582	99506107	SBE	POL	C	T	0
97	brak	99506401	DEL	DC	C	0	SPL
98	76133807	99506411	SBE	DC	C	T	0
99	brak	99506411	DEL	DC	C	0	SPL
100	Nowy; Dla tej pozycji istnieje rs1434439068 G>T, w obecnych badaniach jest G>C.	99506415	SBE	DC	G	C	SPL
101	brak	99506438	DEL	DC	A	0	SPL
102	brak	99506455	SBE	DC	T	G	0
103	brak	99506456	SBE	DC	T	G	SPL

104	brak	99506503	SBE	POL	G	T	SPL
105	187072868	99506580	SBE	DC	G	A	SPL
106	72754807	99506740	SBE	POL	G	A	SPL
107	139748785	99506766	SBE	POL	C	G	0
108	brak	99506815	SBE	POL	A	G	SPL
109	78894779	99506979	SBE	POL	T	C	0
110	142414820	99507000	SBE	DC	G	A	SPL
111	brak	99507133	DEL	POL	(TC) ₂	0	SPL
112	561767660	99507249	SBE	POL	A	G	0
113	brak	99507431	SBE	DC	T	A	SPL
114	brak	99507433	SBE	DC	A	T	SPL
115	brak	99507441	DEL-INS	DC	AT	A	SPL

Rodzaje defektów: DEL- delecja, INS- insercja, DEL-INS- usunięcie i wstawienie, SBE- pojedyncza zmiana nukleotydu. **Rodzaje efektów:** SPL-PROT F – zaburzenie *splicingu* skutkujące zmianą funkcji białka, NMD- degradacja mRNA zawierającego nieprawidłowy przedwczesny kodon stop, SPL-zaburzenie *splicingu*, *Frame shift*- zmiana ramki odczytu, SPL- zaburzenie *splicingu*. **Patogenność:** DC- wariant powodujący chorobę, DCA- automatyczny wariant powodujący chorobę (wariant o udokumentowanej patogenności), POL- polimorfizm predykcyjny funkcjonalny, POL-A polimorfizm predykcyjny automatyczny na podstawie wysokiej częstości w populacji (MAF<0,1),

LINKI INTERNETOWE:

Analiza częstości i rozkładu genotypów <https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>

Mutation Taster: <http://www.mutationtaster.org/StartQueryEngine.html>

PhenIX <http://compbio.charite.de/PhenIX/>

Thermo Fischer Scientific: <http://www.ampliseq.com>

Struktura graficzna i schematy genów GSDS: <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>

GUS: <https://stat.gov.pl> › zdrowie › stan-zdrowia-ludnosci-polski-w-2014-r-

POLKARD: <https://www.gov.pl/web/zdrowie/program-profilaktyki-i-leczenia-chorob-ukladu-sercowo-naczyniowego-polgard-na-lata-2017-2020>

Analiza miejsc wiązania miRNA - TargetScan: <http://www.targetscan.org>.



KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 338/14

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz.480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespożywanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawą z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz.U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 03 kwietnia 2014 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu:

dr hab. Katarzyna Ziemnicka prof. UM oraz dr Bartłomiej Budny

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób
Wewnętrznych UM w Poznaniu**

Główny badacz: lek. Monika Gołąb

Członkowie zespołu

badawczego:

dr hab. Katarzyna Ziemnicka prof. UM

dr Bartłomiej Budny

mgr anal. Elżbieta Wrotkowska

techn. anal. Małgorzata Ostrowska- Malczewska

Temat badań:

**„Analiza występowania mutacji polimorfizmów genów receptorów
wybranych hormonów u kobiet z otyłością”.**

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński