

**MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

MAJA FRANIĆ-IVANIŠEVIĆ

**ANALIZA POLIMORFIZMA U GENIMA
ZA RECEPTORE POLNIH STEROIDA
KOD ŽENA SA PRIMARNOM
PREVREMENOM INSUFICIJENCIJOM
OVARIJUMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

MAJA FRANIĆ-IVANIŠEVIĆ

**THE ANALYSIS OF POLYMORPHISM IN
THE GENES FOR THE RECEPTORS OF
SEX STEROIDS IN WOMEN WITH THE
PREMATURE OVARIAN FAILURE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

MENTOR: Prof. dr. Svetlana Vujović, redovni profesor, Institut za endokrinologiju i bolesti metabolizma KCS, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof.dr. Svetlana Dragojević-Dikić, vanredni profesor, Klinika za ginekologiju i akušerstvo “Narodni front”, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
2. Prof.dr. Ivana Novaković, redovni profesor, Klinika za neurologiju KCS, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
3. Prof.dr. Spasoje Petković, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u penziji.

Zahvaljujem se

Prof. dr. Svetlani Vujović, svom mentoru i prijatelju, na zalaganju, posvećenosti, edukaciji i beskrajnoj podršci koja traje od mojih studentskih dana.

Prof. dr. Spasoju Petkoviću, svom učitelju, na velikoj podršci i edukaciji. Sretna sam da sam bila deo njegovog tima.

Svojoj porodici, majci i prijateljici Ivani Simović na beskrajnoj podršci i ljubavi, bez čega ovog uspeha ne bi bilo.

POSVETA

Rad posvećujem svojoj deci, Milici i Ivanu, sa nadom da će oni jednog dana u nauci rasvetliti ono što je nama ostalo nepoznato.

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Definicija i etiologija PPOI	1
1.2.	Genetički uzroci.....	4
1.2.1.	Mutacija gena za FSH receptor	5
1.2.2.	Aberacije X hromozoma	5
1.2.3.	Mutacije gena za transkripcione faktore	7
1.2.4.	Faktori razvoja folikulogeneze	10
1.3.	Klinička slika.....	12
1.4.	Dijagnoza.....	14
1.5.	Terapija.....	15
2.	Ciljevi.....	17
3.	Materijal i metode.....	18
3.1.	Određivanje broja ponovaka u okviru mikrosatelitnih polimorfizama gena za ESR1(TA) _n , ESR2(CA) _n , AR(CAG) _n , i AR(GGN) _n žena iz Srbije	18
3.1.1.	Selekcija ispitanika	18
3.1.2.	Genotipizacija mikrosatelitnih ponovaka.....	19
3.1.3.	Kontrola kvaliteta.....	20
3.2.	Određivanje povezanosti između polimorfizama gena za ESR1 i PPOI kod žena iz Srbije.....	20
3.2.1.	Selekcija ispitanika.....	20
3.2.2.	Analiza genotipa.....	21
3.3.	Ispitivanje varijanti koje se nalaze u velikoj Han kineskoj kohorti-8q22.3 SNPs rs3847153 i rs 3108910 i po jedan SNP u HK3 (rs2278493), ESR1 (rs2234693) i BRSK 1 (rs12611091) i njihove povezanosti sa PPOI kod žena iz Srbije.....	22
3.3.1.	Selekcija ispitanika.....	22
3.3.2.	Analiza genotipa.....	23
3.4.	Doprinos varijanti SOHLH2 gena primarnoj prevremenoj insuficijenciji ovarijuma kod žena u različitim etičkim grupama.....	24
3.4.1.	Selekcija ispitanika.....	24
3.4.2.	Analiza genotipa sekvenci SOHLH2 gena.....	24
3.5.	Karakteristike žena iz Srbije sa PPOI i različitim varijantama SOHLH2 gena.....	26
3.5.1.	Selekcija ispitanika.....	26
3.5.2.	Laboratorijske analize	26
3.6.	Odnos između COLIA1 genskog polimorfizma i indeksa mineralne gustine kostiju (BMD) kod žena iz Srbije sa PPOI-om	26
3.6.1.	Selekcija ispitanika.....	26

3.6.2.	Biohemijska i genetska ispitivanja	27
3.7.	Statistička analiza	28
4.	Rezultati.....	31
4.1.	Ispitivanja mikrosatelitnih polimorfizama gena za receptore gonadnih steroida kod srpskih žena sa PPOI	31
4.1.1.	Distribucija alela svakog pojedinačnog mikrosatelita ESR1(TA) _n , ESR2(CA) _n , AR(CAG) _n i (GGN) _n između 196 ispitanica sa PPOI-om i 544 kontrolnih	31
4.1.2.	Dužina ponovaka u ESR1	34
4.1.3.	Dužina CA ponovaka u ESR2	34
4.1.4.	Dužina CAG ponovaka u AR.....	36
4.1.5.	Oraničenja i razlozi za oprez	36
4.1.6.	Šire implikacije nalaza	36
4.2.	Ispitivanja povezanosti između polimorfizama gena za ESR1 i PPOI.....	36
4.3.	Ispitivanja da li su varijante koje se nalaze u velikoj Han kineskoj kohorti-8q22.3 SNPs rs3847153 i rs 3108910 i po jedan SNP u HK3 (rs2278493), ESR1 (rs2234693) i BRSK 1 (rs12611091) povezane sa PPOI u srpskoj kohorti	38
4.4.	Ispitivanja novih varijanti u SOHLH2 genima kod žena iz Kine i Srbije sa PPOI	39
4.4.1.	Funkcionalni efekti varijanti SOHLH2 gena specifične za žene iz Kine i Srbije sa PPOI.....	40
4.4.2.	Analiza novih SNP u SOHLH2 genu prisutnih kod žena iz Kine sa PPOI i kontrola.....	41
4.4.3.	Poznati SNP u SOHLH2 identifikovani kod žena iz Kine sa PPOI i kontrola.....	42
4.4.4.	Poznati SNP u SOHLH2 genu identifikovani kod žena iz Srbije sa PPOI i kontrola	43
4.5.	Ispitivanja karakteristika žena iz Srbije sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2	44
4.5.1.	Poređenje vrednosti hormona FSH, LH, prolaktina, estradiola i progesterona	44
4.5.2.	Poređenje godina starosti pri ulasku u menopauzu kod žena sa PPOI i žena sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2 gena.....	48
4.6.	Ispitivanja za kolagen Tipa I Alfa 1 genskog polimorfizma kod žena iz Srbije sa PPOI	51
5.	Diskusija	56
6.	Zaključci	63
7.	Literatura	64

SAŽETAK

Uvod:

Prosečna starost za ulazak u menopauzu u populacijama žena zapadnih zemalja je približno 51 godina. Prevrmenu disfunkciju ovarijuma (POI) karakteriše amenoreja, hipoestrogenizam i povišeni gonadotropini kod žena mlađih od 40 godina. Uzroci POI su heterogeni, uključujući aberacije X hromozoma, infekcije, jatrogene uzroke (hirurgija, hemoterapija, zračenje) i autoimmune bolesti. Oko 20-30% žena sa POI ima i porodičnu anamnezu, sa ženskim članovima porodice koji nose istu dijagnozu. Stoga je genetska osnova za poremećaj verovatno uzrok ovog kliničkog stanja. Poznato je da normalni razvoj i funkcija jajnika zahtevaju ekspresiju i pravilnu koordinaciju mnogih gena. Navedeni mehanizmi su većinom nepoznati i uprkos genetskim defektima koji su identifikovani u nekoliko gena kandidata, u velikom broju POI slučajeva nije pronađen nijedan uzrok i zato su klasifikovani kao idiopatski POI. S obzirom da su veličina inicijalne folikularne formacije i brzina folikularnog trošenja povezane sa starošću pri menopauzi i s obzirom na činjenicu da ovi zametci ćelija izražavaju gonado steroidne receptore u različitim fazama razvoja, moguće je da genetičke varijante u genima za receptore polnih steroida, koje su uključene u održavanje funkcije jajnika, mogu uticati na rizik od PPOI. Osnovni modulatori folikulogeneze su estrogenski receptori ($ER\alpha$ i $ER\beta$) koji direktno kroz regulisanje hipofiza-gonadne ose omogućavaju delovanje estrogena. Sekventni polimorfizam $ER\alpha$ gena (ESR1:estrogen receptor 1) je pokazao povezanost sa osteoporozom, neobjašnjivom neplodnošću, nižim odgovorom na stimulaciju jajnika, fibromima u materici i endometriozom. Nedavna istraživanja su pokazala da su mikrosatelitni polimorfizmi gena za ESR1 povezani sa PPOI u korejskoj kohorti. Nedostatak estrogena povezan je sa povećanim poremećajem kostiju, ubrzanim gubitkom kostane mase što dovodi do povećane podložnosti osteoporozi i frakturi kostiju. Nasleđivanje koštane mase je pod poligenskom kontrolom. SOHLH1 i SOHLH2 geni su faktori transkripcije vazni za razvoj PPOI. SOHLH2 gen nalazi se na 13 hromozomu, i jedan je od testis-specifičnih faktora koji su od suštinske važnosti za spermatogenezu, ovogenezu i folikulogenezu. SOHLH 1 i 2 geni su izraženi isključivo

u primordijalnim folikulima do primarne folikularne faze i predstavljaju master regulatore gena jajne ćelije odgovorne za rani rast i diferencijaciju folikula.

Ciljevi:

1. Ispitati da li polimorfizmi mikrosatelitnih ponovaka u genima za estrogenski receptor alfa - ESR1(TA)_n, estrogenski receptor beta - ESR2(CA)_n, androgenskih receptora - AR(CAG)_n, i AR(GGN)_n predstavljaju etiološki čimilac u nastajanju PPOI-a kod žena iz Srbije.
2. Ispitati da li su polimorfizmi gena za ESR1 povezani sa PPOI kod žena iz Srbije.
3. Ispitati da li su varijante koje se nalaze u velikoj Han kineskoj kohorti-8q22.3 SNPs rs3847153 i rs 3108910 i po jedan SNP u HK3 (rs2278493), ESR1 (rs2234693) i BRSK 1 (rs12611091) povezane sa PPOI u srpskoj kohorti
4. Ispitati da li varijante u SOHLH2 genu doprinose primarnoj prevremenoj insuficijenciji ovarijuma (PPOI) kod žena u različitim etičkim grupama.
5. Ispitati karakteristike žena iz Srbije sa PPOI i različitim varijantama SOHLH2 gena.
6. Ispitati odnos između COLIA1 genskog polimorfizma i indeksa mineralne gustine kostiju (BMD) kod žena iz Srbije sa PPOI-om.

Materijal i metode:

1. U prvoj studiji ispitivanja potencijalne uloge mikrosatelitnih polimorfizama gena za gonadne steroidne receptore kod žena iz Srbije sa primarnom prevremenom ovarijalnom insuficijencijom (PPOI) kohorta je obuhvatala 196 PPOI slučajeva koji su upareni sa 544 zdravih žena sa urednim menstrualnim ciklusima, kontrolna grupa. Pacijentkinje su bile okupljene od strane Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Srbije između 2007. i 2010. godine. Genomska DNK je izolovana iz pljuvačke koristeći Organe® kompleta za prikupljanje uzoraka DNK. TA ponavci ESR1, CA ponavci ESR2, CAG i GGN ponavci AR su genotipizirani utvrđivanjem PCR sadržaja i analizirani su pomoću Genemapper softvera za utvrđivanje ponovaka. Od statističkih analiza korišćen je Studentov T-test za poređenje frekvence alela između PPOI pacijenata i kontrola. Poređenje raspodela genotipa između ispitivane i kontrolne grupe je urađeno pomoću logičnog regresionog modela. Odnos kvote (OR) je izračunat logičnom regresionom

analizom sa intervalom poverenja od 95% (CIs). Svi rezultati sa "p" vrednošću manjom od 0.05 su smatrane statistički značajnim.

2. U drugoj studiji ispitivanja povezanosti između polimorfizama gena za ESR1 i PPOI kod žena iz Srbije, ispitivali smo 197 PPOI slučajeva i 547 plodnih kontrola. Pacijentkinje su bile okupljene od strane Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Srbije između 2007. i 2010. godine. Genomska DNK je izolovana iz pljuvačke korišćenjem kompleta Organe®DNA za uzimanje uzorka. Dva jednonukleotidna polimorfizma (SNP), Pvu II i Xba I, u ESR1 su genotipizirana dinamičkom alel-specifičnom hibridizacijom. Analize halotipa su izvedene metodom restrikcionih dužina fragmenata polimorfizma. SNP i halotipni efekti su bili analizirani logističkom regresijom modela.
3. U trećoj studiji pri ispitivanju da li su varijante koje se nalaze u velikoj Han kineskoj kohorti-8q22.3 SNPs rs3847153 i rs 3108910 i po jedan SNP u HK3 (rs2278493), ESR1 (rs2234693) i BRSK 1 (rs12611091) povezane sa PPOI u srpskoj kohorti, ispitivali smo 197 srpskih žena sa PPOI i 552 zdrave žene sa urednim menstrualnim ciklusima i normalnim vrednostima FSH, koje su bile kontrolna grupa. Sve žene bile su prikupljene od strane Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Srbije između 2007. i 2010. godine. DNK je izolovana iz pljuvačke pacijenata obe grupe pomoću Organe® DNA kita za prikupljanje uzoraka (DNA Genotek). Topljenje visoke rezolucije (HRM) je prethodilo direktnom sekvencioniranju. PCR-HRM je izveden na Roche Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science). Proizvodi PCR su sekvencionirani na ABI 3730 DNK analizatoru sa BigDiy Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitom (Applied Biosystems). Statistika: Fišer-ov test je korišćen za testiranje Hardy-Weinberg ekvilibrijuma i razlike u frekvenciji alela. Vrednost P koja je bila manja od 0.05 smatrala se statistički značajnom.
4. U četvrtoj studiji: I-Kod ispitivanja novih varijanti u SOHLH2 genima, ispitivali smo 364 kineske žene sa PPOI i 197 srpskih žena sa PPOI i etički odgovarajućih kontrolnih pacijenata. Kontrolna grupa je obuhvatala zdrave žene sa redovnim menstrualnim ciklusima i normalnim nivoima estrogena i gonadotropina, 400 kineskih žena i 200 srpskih žena. Radili smo analizu varijacije SOHLH2 gena. Genomska DNK je ekstrahovana iz uzoraka periferne krvi korišćenjem QIAamp

DNA Blood Mini Kit (Qiagen) i Oragene® kit skupljanje DNK (DNA Genotek). Statistika: Chi-square test ili Fišerov test je korišćen za poređenje razlika distribucije genotipa i frekvencije alela.

II- Ispitivanja karakteristika žena iz Srbije sa PPOI i različitim varijantama SOHLH2 gena; studija je obuhvatila 168 žena iz Srbije sa dijagnozom idiopatskog POF-a. Žene su bile okupljene od strane Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Srbije u periodu od 2007-2010 godine. Prvu grupu su činile 159 žene sa PPOI, a drugu je činilo 9 žena sa PPOI koje su imale neku od varijanti SOHLH2 gena koje su nađene kod srpskih žena u predhodnoj studiji. Svim ženama su uradjene hormonske analize, izmerena težina, visina i uzeta anamneza o godinama starosti pri ulasku u PPOI. Statistika: T-test i Mann-Whitney test.

5. U petoj studiji ispitivanja korelacije kolagena tipa I Alfa 1 (COLIA) genskog polimorfizma sa gustinom kostiju (BMD) kod žena sa PPOI utvrdili smo COLIA 1 genotipove SS, Ss, ss kod 66 žena sa PPOI. Pacijentkinje su bile okupljene od strane Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Srbije između 2007. i 2010. godine. Jednonukleotidni polimorfizam (substitucija G sa T) u okviru Sp 1-polimeraze (PCR) praćen analizom jednolančane konformacije polimorfizma (SSCP). Mineralna gustina kostiju (BMD) je merena u delu lumbalne kičme sa absorptimetrijom dualnim X-zracima. Od statističkih analiza korišćen je Kruskal-Wallis ANOVA, Chi-square test, Spermanov test korelacije.

Rezultati:

1. PPOI pacijenti su nosili kraće ponavljanje dužine ESR2(CA), nego ispitanice kontrolne grupe ($p=0.034$) kod žena iz Srbije, ali je razlika bila mala. ESR1(TA) je bio na granici statističke razlike između grupa ($p=0.059$). AR(CAG) i (GGN) nije imao nikakvu povezanost sa PPOI kod žena iz Srbije.
2. Nisu nađene statistički značajne razlike u distribuciji ESR1 Pvu II i Xba I polimorfizma ili haplotipovima između PPOI i kontrolne grupe.
3. Ni jedna SNP asocijacija koja je povezana sa PPOI i pronađena u kineskoj kohorti nije povezana kod srpskog uzorka žena.
4. I-Jedanaest novih heterozigotnih varijanti je indentifikovano u našim grupama žena sa PPOI, ali su odsutni u kontrolnim, što je rezultiralo u učestalosti SOHLH2 varijante od 2.2%(8/364, kineskih) i 3.6% (7/197, srpskih), respektivno. Od toga,

p.Glu79Lis (2 slučaja), p.Glu105Gli i p.Thr321Pro identifikovano kod četiri kineske žene i p.Leu120Phe (3 slučaja) i p.Leu204Phe kod četiri srpske žene, nisu bili identični. Poravnanje proteina otkrilo je da su p.Glu79Lis i p.Glu105Gli uključili aminokiseline visoko očuvane među sisarima, koji su bili predpostavljeni da su štetni. C-210G>T varijanta nađena kod kineske PPOI kohorte leži u jezgru regiona promotera visoko koncentrisana sa predpostavljenim faktorom transkripcije vezivanja i CpG ostrvima. Kod srpske kohorte, varijanta koja najverovatnije ima štetan uticaj je c.530+6T>G, za koju se predpostavlja da utiče na spajanje RNK i rezultuje u besmislenom posredovanju propadanja (NMD) alternativnih transkripata. Ometanje izraza, transaktivaciona aktivnost ili homo/hetero-dimerizacija SOHLH2 proteina može da dovede do disfunkcije jajnika.

II- Dobijeni rezultati ukazuju da nema statistički značajne razlike između grupa u hormonskom statusu za FSH, LH, E₂, prolaktin i progesteron ($p < 0.05$), godinama starosti pri ulasku u menopauzu ($t=1.963$; $p=0.051$), kao ni između vrednosti BMI ($t=1.565$; $p=0.120$). Postoji statistički značajna slaba pozitivna povezanost godina starosti pri ulasku u menopauzu i vrednosti BMI kod grupe sa PPOI ($r=0.284$; $p=0.001$). Ne postoji statistički značajna povezanost godina starosti pri ulasku u menopauzu i vrednosti BMI kod grupe sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2 ($r=0.012$; $p=0.978$).

5. Relativna distribucija COLIA 1 genotip alela je SS-54.4%, Ss-41.0% i ss-4.5%. Nije nađena statistički značajna razlika između grupe genotipova u indeksu telesne mase (BMI), starosti, trajanja amenoreje ili BMI. Značajna pozitivna korelacija je uočena između BMI i pariteta.

Zaključak:

- PPOI se smatra multifaktorijalnom bolešću, gde je fenotip najverovatnije posledica varijacije sekvence u više od jednog gena.
- Pacijenti sa PPOI nose kraće ponovke u ESR1(TA)_n i ESR2(CA)_n i S aleli u ovim genima mogu se smatrati kao faktori rizika za PPOI kod žena iz Srbije.
- Dva ESR1 SNP, Pvu II i Xba, nisu uobičajno povezani sa PPOI kod žena iz Srbije i ne mogu da doprinesu genetskoj osnovi PPOI.
- Etički različiti narodi mogu da pokazuju razlike u putevima genske regulacije i gena koji uzrokuju PPOI.
- Naša identifikacija novih varijanti SOHLH2 gena kod žena iz Kine i Srbije sa PPOI, snažno ukazuju na važnu ulogu SOHLH2 gena u etiologiji PPOI.
- Nove nesinonimne heterozigotne varijante SOHLH2 gena specifične za žene iz Kine sa PPOI su: p.Glu79Lys (štetna), p.105Gly (štetna), p.Thr321Pro.
- Nove nesinonimne heterozigotne varijante SOHLH2 gena specifične za žene iz Srbije sa PPOI su: p.Leu120Phe, p.Leu204Phe.
- Kod mlađih žena sa PPOI COLIA1 gen ne može identifikovati one koji su u većoj opasnosti od osteoporoze.

Ključne reči: prevremena disfunkcija janika, estrogenski receptor, androgeni receptor, mikrosatelitski polimorfizam, COLIA1, genski polimorfizam, osteoporoza, SOHLH2, BRSK1, HK3, BRSK2, PPOI-8q22.3.

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: reproduktivna endokrinologija i genetika

SUMMARY

Background:

The average age for menopause in Western populations is approximately 51 year. Premature ovarian failure (POI) is characterised by amenorrhoea, hypoenestrogenism and elevated gonadotropins and affects of women under the age of 40. The causes of POI are heterogeneous, including chromosome X defects, infections, iatrogenic (surgery, chemotherapy, radiation), and autoimmune disease. Approximately 20-30% of women with POI will have other affected female members, hence a genetic basis for the disorder is a likely cause for this clinical scenario. It is known that normal ovarian development and function require the expression and proper coordination of many genes. The underlying mechanisms are largely unknown and despite the genetic defects identified in several candidate genes, in a large proportion of POI cases no cause has been found; and hence they are classified as idiopathic POI. Considering that initial follicular pool size and the rate of follicular depletion are associated with the age of menopause and given the fact that these germ cells express gonadal steroid receptors at various stages of development, it is plausible that genetic variants in sex hormone receptor genes involved in maintaining ovarian function could affect the risk of POI. Estrogen actions mediated through its cognate receptors (ER α and ER β) are essential modulators of folliculogenesis, directly through regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Sequence polymorphisms of the ER α gene (ESR1: estrogen receptor 1) have been shown to be associated with osteoporosis, unexplained infertility and lower response to ovarian hyperstimulation, and uterine fibroids and endometriosis. A recent study reports that ESR1 gene polymorphisms are associated with POI in Korean cohort. Deficiency of estrogen, a critical reproductive hormone for bone acquisition, is associated with an increased bone turnover and accelerated bone loss, leading to the increased susceptibility to osteoporosis and bone fractures. The inheritance of bone mass is under polygenic control. SOHLH 1 and 2 are transcription factors involved in etiology of POI. SOHLH2 gene is situated on chromosome 13 and is testis-specific factor important for spermatogenesis, oogenesis and folliculogenesis. Both, SOHLH 1 and 2, are expressed exclusively in primordial follicles up until the primary follicle stage, and are master regulators of oocyte-specific genes critical for early follicle growth and differentiation.

Objectives:

1. To investigate do microsatellite polymorphisms of the estrogen receptor alpha (ESR1) TA repeat, estrogen receptor beta (ESR2) CA repeat, androgen receptor (AR) CAG and GGN repeats, contribute to premature ovarian failure (PPOI) in Serbian women.
2. To investigate whether these genetic polymorphisms of ESR1 are associated with PPOI in Serbian women.
3. To identify whether variants found in large Han Chinese cohort-8q22.3 SNPs rs 3847153 and rs3108910; and one SNP each in HK3 (rs2278493), ESR1 (rs2234693) and BRSK1 (rs12611091)- are associated with premature ovarian failure (PPOI) in a different ethnic group (Serbian).
4. To determine whether variants in the SOHLH2 gene contribute to human premature ovarian failure (PPOI) in different ethnicities.
5. To investigate women's characteristic with PPOI and those with PPOI where some variants of SOHLH2 were found.
6. To correlate collagen type I alpha 1 (COL1A1) gene polymorphism with bone mineral density (BMD) in women with PPOI.

Desing and methods:

1. A cohort of 196 PPOI cases matched with 544 fertile controls was recruited by the Clinic for Endocrinology, Diabetes and Metabolic Disorders of Serbia Between 2007 and 2010. Genomic DNA was extracted from saliva using Oragene®DNA sample Collection kits. The TA repeat of ESR1, CA repeat of ESR2, and CAG and GGN repeats of AR were genotyped using a PCR-based assay and were analysed using Genemapper software to determine the repeat lengths. Two-tailed Student's t-test was used to compare allele frequencies between PPOI patient and controls. Comparisons of genotype distributions between the case and control groups were then performed using logistic regression models. Odds ratios (OR) were calculated by logistic regression analysis with 95% confidence intervals (CIs). All statistical results with a P-value less than 0.05 were considered statistically significant.
2. A series of 197 PPOI cases matched with 547 fertile controls was recruited by the Clinic for Endocrinology, Diabetes and Metabolic Disorders of Serbia between 2007 and 2010. Genomic DNA was extracted from saliva using Oragene®DNA sample collection kits. Two single-nucleotide polymorphisms (SNPs), Pvu II and Xba I, in ESR1 were genotyped by dynamic allele-specific hybridization. Haplotype analyses were performed with the restriction fragment length polymorphism method. SNP and haplotype effects were analyzed by regression models.
3. We investigate 197 serbian women with PPOI and 552 healthy serbian women, with regular menses, normal estrogen and gonadotropin hormone levels served as controls. All women were recruited by the Clinic for Endocrinology, Diabetes and Metabolic Disorders of Serbia between 2007 and 2010. Genomic DNA was extracted from saliva using Oragene® DNA collection kits (DNA Genotek). High resolution melting (HRM), followed by direct sequencing was used as reported previously. PCR-HRM was performed on Roche Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science). The PCR products were sequenced on an ABI 3730 DNA Analyzer with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Statistics: Fisher's exact test was used to test the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and allele frequency differences. A p-value of <0.05 was regarded as statistically significant.

4. I-We investigate 364 Han Chinese women and 197 Serbian women with PPOI. Ethnically matched healthy women, with regular menses, normal estrogen and gonadotropin hormone levels served as controls (400 Chinese and 200 Serbian). All were screened for variants in SOHLH2 gene. Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using QIAamp DNK Blood Mini Kit (Qiagen) and Oragene DNK collection kits (DNK Genotek). Statistics: Chi-square test or Fisher's exact test were used for comparison of differences of genotype distribution and allele frequency.

II- We investigate the characteristic of women with PPOI and some variants of SOHLH2 gene. Study covered 168 Serbian women with PPOI. The women was recruited by the Clinic for Endocrinology, Diabetes and Metabolic Disorders of Serbia between 2007 and 2010. First group was formed by 159 women with PPOI and the second group formed by 9 women with PPOI and some variants SOHLH2 gene. Hormonal analysis, body height and weight was measured for all women. The difference in FSH, LH, E₂, PRL, P and BMI was investigate. For the statistic analysis Mann-Whitney U test and T-test was used.

5. We determined the COLIA 1 genotypes SS, Ss and ss in 66 women with PPOI. The women was recruited by the Clinic for Endocrinology, Diabetes and Metabolic Disorders of Serbia between 2007 and 2010. Single nucleotide polymorphism (G to T substitution) within the Sp 1-binding site in the first intron of the COLIA 1 gene was assessed by polymerase chain reaction (PCR) followed by single-stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis. Bone mineral density (MBD) was measured at the lumbar spine region by dual X-ray absorptiometry. Statistics: Kruskal-Wallis ANOVA, Chi-square test, Spearman correlation test.

Results:

1. PPOI patients carried shorter repeat lengths of ESR2(CA)_n than controls ($p=0.034$) in Serbian women, but the difference was small. ESR1(TA)_n was on the borderline of statistical differences between groups ($p=0.059$). AR(CAG)_n and AR(GGN)_n had no association with the disease among Serbian women.
2. No significant difference was found in the distribution of ESR1 PvuII and Xba I polymorphisms or haplotypes between the PPOI and control groups.

3. None of the SNPs found associated with PPIO in Chinese cohort were found to be associated in the Serbian sample.
4. I-Eleven novel heterozygous variants were identified in our cohorts of women with PPOI but were absent in matched controls, which resulted in the frequency of SOHLH2 variants being 2.2% (8/364, Chinese) and 3.6% (7/197, Serbian), respectively. Of these p.Glu79Lis (2cases), p.Glu105Gli and p.Thr321Pro identified in four Chinese women and p.Leu120Phe (3cases) and p.Leu204Phe found in four Serbian were non-synonymus. Protein alignment revealed that p.Glu79Lys and p.GLU105Gly involved amino acids highly conserved among mammals, both of which were predicted to be deleterious. The c-210G>T variants found in Chinese PPOI cohort lies in the core promoter region highly concentrated with putative transcription factor binding sites and CpG islands. In the Serbian cohort, the variant most likely to have a deleterious effect was c.530+6T>G, which was predicted to effect RNA splicing and result in nonsense mediated decay (NMD) of alternative transcripts. Disturbing the expression, transactivation activity or homo/hetero-dimerization of SOHLH2 protein could result in ovarian failure.

II- The results showed no statistical difference between the 2 groups for FSH (U=614.0; p=0,475), LH (U=496.0; p=0.665), PRL (U=600.5; p=0.418), P (U=620.5; p=0.503) as well, as for BMI(r=0.284; p=0.001) and the age when women entered PPOI (t=1.963; p=0.051). There was statistically significant correlation between the age of onset of menopause and BMI in group of women with PPOI(r=0.284; p=0.001). There was no statistically significant correlation between the age of onset of menopause and BMI in group of women with PPOI and some of genetic variation of SOHLH2 (r=0.012; p= 0.978).

5. The relative distribution of COLIA 1 genotype alleles was SS-54.4%, Ss-41.0% and ss-4.5%. No significant differences were found between genotype groups in body mass index, age, duration of amenorrhea or BMD. A significant positive correlation was observed between BMI and parity.

Conclusions:

- PPOI is now considered a multifactorial disease, where the phenotype is most probably the result of sequence variation in more than one gene.
- PPOI patients carry shorter repeats in ESR1(TA)_n, and ESR2(CA)_n, and S alleles in these genes might be considered as risk factors in PPOI in Serbian women.
- The two ESR1 SNPs, PvuII and XbaI, are not commonly associated with PPOI in Serbian women and may not contribute to the genetic basis of the condition.
- Ethnically distinct populations may show differences in gene-regulating pathways and genes causing PPOI.
- Our identification of novel heterozygous variants in the SOHLH2 gene, in women with PPOI of both Chinese and Serbian origin, suggests a contribution to the etiology of PPOI.
- Novel heterozygous variants for the SOHLH2 gene were identified in Chinese women: p.Glu79Lis (damaging), p.Glu105Gln (damaging), p.Thr321Pro, and in Serbian women: p.Leu120Phe, p.Leu204Phe.
- In young women with PPOI COLIA1 cannot identify those at higher risk for osteoporosis.

Key words: premature ovarian failure, estrogen receptor, androgen receptor, microsatellite polymorphism, COLIA1, genes polymorphism, osteoporosis, SOHLH2, BRSK1, HK3, BRSK2, PPOI-8q22.3

Scientific filed: medicine

Major in: endocrinology and genetic

1. UVOD

1.1. DEFINICIJA I ETIOLOGIJA PPOI

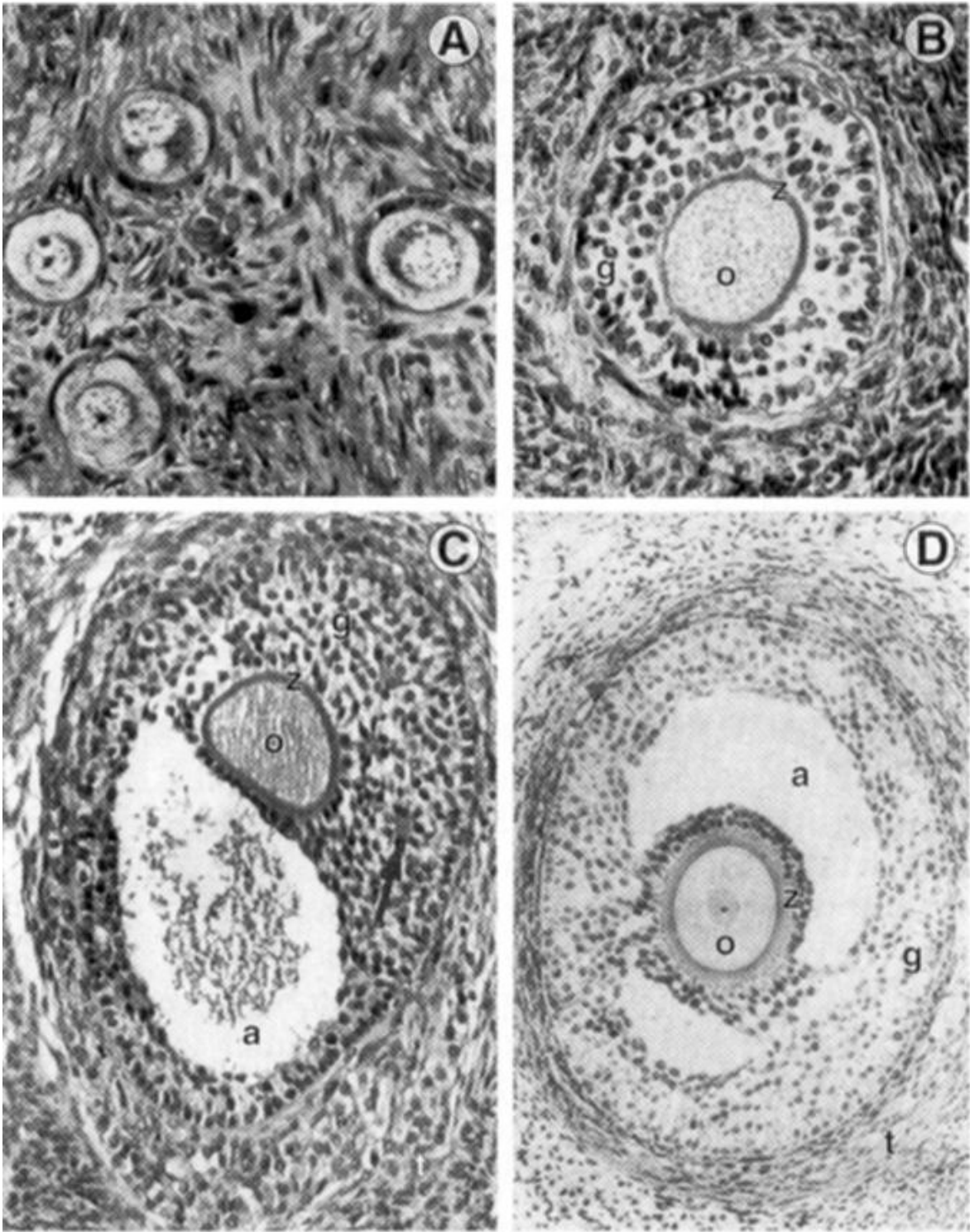
De Moraes Rueshen M i Jones GS. su 1967.god. prvi postavili definiciju primarne prevremene insuficijencije ovarijuma (PPOI) kao nefiziološkog prekida menstruiranja nastalog posle puberteta, a pre 40. godine života (1). PPOI je sindrom koji se odlikuje hipergonadotropnom amenorejom i hipoestrogenijom. Kriterijumi za dijagnozu su folikulostimulišući hormon (FSH) veći od 40 IU/L i estradiol (E₂) manji od 50 pmol/L (2).

Incidenca PPOI je 0,9-3% među ženama reproduktivnog doba . U 10-28% POI je uzrok primarnih, a u 4-18% sekundarnih amenoreja (3).

Bolest nastaje kao posledica ubrzanog procesa atrezije oocita, smanjenja broja germinalnih ćelija i starenja centralnog nervnog sistema. Specifični geni su odgovorni za kontrolu broja ovocita koji prolaze proces ovulacije i vreme prekida reproduktivne funkcije (4). Pozitivna porodična anamneza PPOI nađena je u oko 15% žena sa PPOI, što ukazuje na postojanje određene genetske etiologije(5,6). U kombinaciji poznate mutacije se mogu objasniti samo kod 1-2% PPOI slučajeva sa učestalosti variranja u različitim etičkim grupama . Postavlja se pitanje postojanja zajedničkog puta koji kontroliše atreziju jajne ćelije ili se aktivira različitim mutacijama gena kandidata koje su različito izražene kod različitih etičkih grupa (7,8).

Proces mitoze i mejoze se paralelno dešavaju do 20. nedelje gestacije i tada prestaje deoba i sazrevanje budućih ovocita. Broj ovogonija koje novorođenče ima na rođenju je fiksna, tj. nema kasnijeg umnožavanja. Maksimalan broj primordijalnih folikula u organizmu ženskog deteta je u 20-24. nedelji gestacije od kada počinje proces atrezije tako da se broj primordijalnih folikula od 6-7 miliona smanjuje na 1-2 miliona na rođenju i 300 000-400 000 po ulasku u pubertet. Steroidogeneza se odvija sve dok postoji i poslednji folikul. Smatra se da sa smanjenjem broja primordijalnih folikula ispod 2500 u oba ovarijuma počinju da se javljaju tipične tegobe vezane za klimakterijum. Već od 30. godine FSH se postepeno povećava u folikulinskoj fazi a posle 40. godine postoji dalji porast koji je u korelaciji sa brojem preostalih folikula.

Primordijalni folikuli se razlikuju od primarnih po tome što predstavljaju ovcite okružene jednim slojem granuloza ćelija. Primarni folikuli su oociti okruženi sa više slojeva kuboidnih granuloza ćelija (Slika br.1). Jedan od mogućih etioloških činilaca za PPOI je poremećaj na nivou prelaska primordijalnih u primarne folikule. U Tabeli 1. prikazana je etiologija PPIO.



Slika br. 1. Primordijalni, primarni, sekundarni i Graaf-ov folikul

Tabela 1. Etiologija PPOI

GENETIČKI UZROCI	<ul style="list-style-type: none">- Mutacija FSH receptora,transkripcionog faktora, fragilni X hromozom.- Strukturne alteracije i odsustvo X hromozoma- Trizomija X hromozoma sa ili bez mozaicizma- PPIO udružen sa miotrofičnom distrofijom
ENZIMSKI DEFICIT	<ul style="list-style-type: none">- 17 α hidroksilaza- Galaktozemija
FIZIČKI AGENSI	<ul style="list-style-type: none">- Zračenje- Hemioterapija- Virusi- Pušenje- Obostrana adneksektomija
IMUNOLOŠKI POREMEĆAJ	<ul style="list-style-type: none">- Udruženost sa autoimunim bolestima- Aplazija timusa
DEFEKTI U STRUKTURI/DEJSTVU GONADOTROPINA	<ul style="list-style-type: none">- Biološki inaktivni gonadotropini- Deficit alfa ili beta subjedinice- Receptorski / postreceptorski defekt
INFektivNI AGENSI	<ul style="list-style-type: none">- Mikoplazma, ureaplazma, hlamidija.
IDIOPATSKI	

1.2.GENETIČKI UZROCI

1.2.1. Mutacija gena za FSH receptor

U određenim porodicama je zapažena familijarna pojava PPOI (baka, majka, ćerka) i u svakoj sledećoj generaciji se dešava nešto ranije. Jedan od mogućih uzroka je mutacija gena za FSH receptor. Inaktivaciona mutacija u genu za FSH receptor ošteti stimulaciju adenilat ciklaze, a receptor ostaje zarobljen intraćelijski. FSH je neophodan za normalnu maturaciju folikula. U poslednjih 50 dana njegovog razvoja zbog mutacije FSH receptora dolazi do blokade maturacije folikula. Iz tog razloga žene sa PPOI imaju veliki broj malih folikula koji ne mogu dalje da se razvijaju. Mutacija je u egzonu 7 gena za FSH receptor lociranom na hromozomu 2p, koja u proteinu dovodi do zamene Ala sa Val na rezidui 189. Mutacije u genu za FSHR su povezane sa FSH rezistencijom što dovodi do povećanja FSH u serumu i nedostatku estrogena. Žene sa kompletnom FSH rezistencijom imaju hipoplastične jajnike i primarnu amenoreju (9). Nekoliko drugih FSHR varijanti su identifikovane kod žena sa PPOI i sekundarnom amenorejom, blagom disfunkcijom jajnika i porodičnom istorijom PPOI (10). Ove FSH varijante su retke i nije pokazano da imaju direktnu ulogu u nastajanju PPOI (11,12).

1.2.2. Aberacije X hromozoma

Abnormalnosti X hromozoma su najčešći genetski uzrok PPOI, čine 12% slučajeva (6,13,14,15). Ove anomalije uključuju potpuno ili delimično deleciju, duplikaciju ili translokaciju X- hromozoma.

- a) Tarnerov sindrom (45X)- monozomija X ima učestalost 1:2500 (16). Tarnerov sindrom povezan je sa niskim rastom, disgenezom gonada i primarnom amenorejom (16). Gubitak ovocita uglavnom počinje u ranom detinjstvu kao posledica ubrzane atrezije folikula (16).
- b) Trizomije X (47XXX) uglavnom nemaju velike medicinske probleme, u nekim slučajevima se javlja PPOI(17). Geni na X-hromozomu su kritični za normalnu funkciju jajnika, i svaka strukturna abnormalnost u toj regiji može dovesti do PPOI (18,11). Groswami i saradnici (19) nalaze da 3,8% pacijenkinja sa PPOI ima trizomiju X hromozoma.

c) Fragilni X hromozom

Nađena je ekspanzija trinukleotidnih ponovaka CGG u prvom egzonu (5'UTR region) FMR1 gena (Xq 27.3). FRAXA, na distalnom delu Xq POI- kritičnog regiona. FMR1 protein se ne eksprimira. Varijacije u dužini CGG ponovaka, koja postoji na 5'UTR delu FMR1 mRNK se označavaju kao normalne (≤ 50), premutacije (50-200), i pune mutacije (≥ 200 ponovaka). Puna mutacija je udružena sa sindromom fragilnog X, čiji je glavni znak mentalna retardacija (20). Nedavno su epidemiološke studije otkrile da je premutacija FMR1 gena povezana sa PPOI kod 6% sporadičnih PPOI slučajeva i 13% PPOI sa familijarnom istorijom(21). FMR1 protein je veoma eksprimiran u germinativnim ćelijama jajnika fetusa kao i na granuloznim ćelijama zrelih folikula (22).

Nosioci ovih permutacionih alela mogu da imaju tri kliničke slike:

- PPOI
- Poremećaj pažnje i druge psihičke promene
- Neurološke bolesti (tremor, ataksija, Parkinsonova bolest)

Hegerman RJ. (23) je ukazao na povezanost PPOI sa tremorom, ataksijom i Parkinsonovom bolešću. To je još jedan dokaz o značaju polnih steroida i na nivou mozga.

U najvećem broju slučajeva PPOI je multifaktorski poremećaj. Poseban značaj u otkrivanju etiologije PPOI imaju studije u kojima se proučava udruženost PPOI sa određenim genskim – DNK polimorfizmima. Genski odnosno DNK polimorfizmi predstavljaju varijacije u naslednoj osnovi čoveka koje se sreću u opštoj populaciji. Po svom fenotipskom efektu oni su u načelu „benigni“, ali mogu predstavljati predispoziciju za pojavu određenog, najčešće multifaktorskog, poremećaja (24).

Poslednjih godina se intenzivno proučavaju polimorfizmi u genima koji kodiraju receptore za steroidne hormone i njihova povezanost sa različitim poremećajima reproduktivnog sistema. Poznato je da normalni razvoj i funkcija jajnika zahtevaju ekspresiju i pravilnu koordinaciju mnogih gena (25). Navedeni mehanizmi su većinom nepoznati i uprkos genetskim defektima koji su identifikovani u nekoliko gena kandidata (26,27), u velikom broju PPOI slučajeva nije pronađen nijedan uzrok i zato su klasifikovani kao idiopatski PPOI.

1.2.3. Mutacija gena za transkripcione faktore

Ukoliko postoje homozigotne mutacije, ćelije granuloze ne prelaze iz skvamoznih u kuboidne, i upravo je to nivo na kome dolazi do greške. Iz ovog razloga odsutni su sekundarni folikuli i javlja se atrezija ovocita (28). Geni koji se specifično ekspimiraju u ovocitu su regulisani posebnim transkripcionim faktorima(14). Skriningom transkripcionih faktora za folikulogenezu pronađeno je nekoliko uzročnih mutacija u genima:NRA1, NOBOX, FIGLA, FOXL2(29,30,31).

Nuklearni receptor podfamilije pete grupe član 1 (NR5A1), poznat kao steroidni faktor 1, je nuklearni receptor čiji je gen lociran na 9q33.3 a uključen je u ranu diferencijaciju gonada (31,32). On modulira steroidogenezu preko regulacije gena uključenih u osovinu hipotalamus-hipofiza-steroidogeneza, kao što su: STAR, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1, LH i INHA (32). Uslovni nokaut za NR5A1 u granuloznim ćelijama miševa izaziva neplodnost, zbog hipoplastičnih jajnika i smanjenog broja ovocita (33).

Homeobox protein (NOBOX) – newborn ovary homeobox gene je ovocit-specifični homeobox gen koji ima ključnu ulogu u folikulogenezi i jedan je od kandidata gena za PPOI (30). Kodira specifične transkripcijske faktore jajne ćelije koji regulišu gene potrebne za rane faze folikulogeneze (34). Korišćenjem nokaut modela miša , dokazano je da NOBOX reguliše ekspresiju različitih gena specifičnih za ovocit uključujući BMP-15 i GDF-9 (34). Izostanak ekspresije NOBOX-a povezan je sa ubrzanim gubitakom ovocita posle porođaja kod miševa (32).

Folliculogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix (FIGLA) – embrion-specifični faktor transkripcije reguliše ekspresiju gena koji iniciraju folikulogenezu i one koji kodiraju zonu pelucidu (ZP1, ZP2, ZP3), neophodnu za oplodnju i opstanak embriona. Bitan je za opstanak ovocita i formiranje primordijalnih folikula (35). Nedostatak dovodi do ubrzanog postnatalnog gubitka primordijalnih folikula kod miševa (36). Postojanost FIGLA kod odraslih žena omogućuje vezivanje za E-box (5-CANNTG-3) na 3Ps (ZP1, ZP2 i ZP3) promoteru (35).

Frkhead box L2 (FOXL2) gen lociran je na 3q23. Ekspimirira se u ćelijama granuloze jajnika od embriogeneze do odrasle dobi (29). Mutacije ovog gena dovode do neuspeha u diferencijaciji granulozna ćelija što dovodi do ranog aktiviranja i iscrpljivanja

primordijalnih folikula (36). FOXL2 mutacije su identifikovane kod 5% nesindromskih PPOI pacijenata što ukazuje da mogu biti povezane sa idiopatskim PPOI (29).

Helix-loop-helix (SOHLH) 1 i 2 su faktori transkripcije važni za razvoj PPOI. Odgovorni su za rani rast i diferencijaciju folikula uljučujući NOBOX, FIGLA, BMP-15 i GDF-9 (14). SOHLH2 gen nalazi se na hromozomu 13. Ovaj gen kodira jedan od testis-specifičnih faktora koji su od suštinske važnosti za spermatogenezu, ovogenezu i folikulogenezu (14). SOHLH1 i SOHLH2 nokaut modeli ženki miševa su udruženi sa neplodnošću i ubrzanim gubitkom folikula, zbog nedostatka u primordijalnoj diferencijaciji ćelija. Oba modela pokazuju atrofirane jajnike bez jajnih ćelija od šeste nedelje života (38). Zhao i saradnici (39) pronašli su tri nove SOHLH1 varijante kao potencijalne uzroke PPOI kod 364 kineskih žena sa PPOI, koje su bile odsutne u kontrolnoj grupi od 400 žena.

Estrogenski receptor (ER)

Estrogen receptori su transkripcioni faktori koji se eksprimiraju u ćelijama teke i granulosa ćelijama, kao i u mnogobrojnim drugim tkivima, koji regulišu ekspresiju različitih gena uključenih u ćelijski rast i razvoj (40). Dva estrogenska receptora su označeni kao ER α i ER β . Estrogen doprinosi regulisanju cikličnog oslobađanja gonadopina preko svog delovanja na estrogenski receptor (ER) alfa, obeležen sa ESR1 u hipotalamus-hipofiznoj osi (41). Gen za ER α je lociran na hromozomu 6q25-27. Njegova promotorska oblast sadrži polimorfan niz TA ponovaka, koji se povezuje sa naslednom prevremenom disfunkcijom ovarijuma, kao i sa smanjenjem koštane gustine i endometriozom. Gen za ER β je lociran na hromozomu 14q23-24. Preko ER β , obeleženog sa ESR2, estrogen poboljšava folikulogenezu (41). U nekodirajućem 3'-regionu ovog gena nedavno je identifikovan polimorfni niz CA ponovaka, za koji se sugeriše da je povezan sa koštanom gustinom kod žena (42). Iako funkcionalni začaj ova dva polimorfizma još uvek nije u potpunosti razjašnjen, ima dokaza da utiču na strukturu i funkciju gena (43). Pokazana je i povezanost između ova dva mikrosatelitna polimorfizma i PPOI-a (44,45).

Progesteronski receptor (PGR)

Gen za progesteronski receptor (PGR) se nalazi na hromozomu 11q22. U ovom genu je otkriveno više polimorfnih regiona, a jedan od funkcionalno najznačajnijih je insercija/delecija Alu sekvence od 306 bp. Smatra se da insercioni alel, označen kao PROGINS, u homozigotnom ili heterozigotnom stanju ima protektivnu funkciju u ženskom reproduktivnom sistemu (46).

Androgenski receptor (AR)

Receptor za androgene (AR) pripada porodici nuklearnih transkripcijskih faktora. AR gen je jedini lociran na X hromozomu, Xq11-12. U ovom genu je identifikovan polimorfizam tipa različitog broja CAG ponovaka, koji kodiraju poliglutaminski niz različite dužine. Ovaj niz utiče na funkciju receptora tako da su duži ponovci povezani sa nižim nivoom funkcije receptora (47). Zapravo, u prvom egzonu AR gena nalaze se dva mikrosatelita polimorfizma, jedan sa CAG ponavcima – (CAG)_n a drugi sa GGN ponavcima- (GGN)_n. Ograničen broj studija otkriva povezanost ponavljanja CAG od AR gena kod PPOI-a (48,49), dok druge nisu potvrdile povezanost (45,50). Za GGN ponavke značajna povezanost sa PPOI je konstatovana kod indijskih žena (50).

Geni kandidati koji su odgovorni za glavne regulatore koštanog metabolizma su geni za: kalcotropni hormon, proteine koštanog matriksa, steroidne hormone i lokalne regulatore koštanog metabolizma. Geni koji regulišu lokalni metabolizam kostiju su geni za: vitamin D receptor, peroksizmalni proliferator-aktivni receptor i kolagen tipa I alfa1 (COLIA1), α_2 HS- glikoprotein, osteokalcin, faktor rasta tkiva β interleukin- 6 i 1, apo-E, Ca-senzitivirajući receptor (51).

Grant i saradnici (52) identifikovali su da polimorfizam pojedinačnog nukleotida G→T u prvom intronu (+1245G→ T) COLIA1 gena utiče na vezujuće mesto za transkripcijski faktor Sp1. Ovo vodika nepravilnoj organizaciji heliksa u regiji važnoj za regulisanje transkripcije kolagena i značajno je povezan sa koštanom masom i osteoporozom. Na bazi ovih saznanja pojavila se ideja o navedenom polimorfizmu kao genetičkom markeru koji može biti od značaja za prepoznavanje žena koje su u riziku od osteoporoze (53). Transkripcijski faktor Sp1 ima veći afinitet za „s“ nego za „S“ alela, što dovodi do pogrešne organizacije ovih lanaca i do osteoporoze.

Neke studije nisu pružile nikakve dokaze za vezu između polimorfizma COLIA1 u tački vezivanja SP1 i osteoporoze (54). Najveća multicentrična studija nedavno sprovedena u Evropi od strane konzorcijuma Genetic Markers of Osteoporosis (GENOMOS) otkrila je malo značajnu vezu između COLIA1 polimorfizma i smanjenog indeksa telesne mase (BMI) (55).

1.2.4. Faktori razvoja folikulogeneze

Gen za morfogenetski protein 15 (BMP-15) nalazi se na Xq11.2, je član familije transformišućeg faktora rasta beta (TGF- β) i kodira protein odgovoran za specifičan rast ovocita koji ima ulogu faktora diferencijacije (56). Učestvuje u stimulaciji folikulogeneze i u sazrevanju folikula (57). Ulogu u folikulogenezi najbolje predstavlja nokaut model kod miševa koji imaju smanjenu plodnost zbog defektnog procesa ovulacije (58). Mehanizmi pomoću kojih BMP-15 utiče na razvoj PPOI trenutno nije poznat.

Gen za faktor rasta (GDF-9) homologe sa BMP-15 i takođe je član TGF- β superfamilije. Nalazi se na 5q23.2. Reguliše primordijalni razvoj folikula i podstiče proliferaciju granulosa ćelija i sazrevanje folikula (59). Stimulacija GDF-9 je neophodna za razvoj primordijalnih folikula (60).

Gen za inhibin alfa (INHA) kodira alfa subjedinicu inhibina A i B, koji zajedno sa odgovarajućim beta subjedinicama (INHB i INHBB) pripadaju TGF- β superfamiliji (61). Produkciju inhibina vrše granulosa ćelije i oni deluju na hipofizu podstičući produkciju FSH (62). Smanjena proizvodnja inhibina je povezana sa povećanom proizvodnjom FSH, što dovodi do povećanog iscrpljivanja ovarijalne rezerve folikula (13). Žene sa idiopatskim PPOI imaju niži nivo inhibina a veći nivo FSH u serumu nego žene iste dobi iz kontrolne grupe, što ukazuje da inhibini imaju važnu ulogu za normalno funkcionisanje jajnika (61). Gena za INHA je dugo bio gen kandidat za PPOI (13). Genetičke studije o INHA varijantama su identifikovale tri polimorfizma u vezi sa PPOI (61). Polimorfizam 769 G>A pokazao je značajnu povezanost u više PPOI populacija nekoliko etičkih grupa (13,63,64). Funkcionalne studije pokazuju da ovaj polimorfizam dovodi do smanjenja aktivnosti inhibina što uzrokuje povećanje folikularnog pražnjenja i na taj način se stvara predispozicija za PPOI (65). U italijanskim i nemačkim kohortama nisu nađene udruženosti INHA varijanti sa PPOI.U

nekim novijim meta-analizama potvrđeno je da je 769A alel redak u nekim etičkim grupama (65,66). Može se zaključiti da ova varijanta INHA povećava rizik za PPOI samo u nekim etičkim grupama što objašnjava razlike u literaturi (59,61).

U Tabeli br.2. prikazani su neki od gena kandidata i njihova funkcija u patogenezi PPOI (67).

Tabela 2. Neki od gena kandidata i njihova funkcija na patogenezu PPOI:

GEN	GEN LOKUS	f-ja GENA
FMR1	Xq27.3	Razvoj i sazrevanje ovocita
NR5A	9q33.3	Steroidogeneza jajnika
NOBOX	7q25	Rana folikulogeneza
FIGLA	2q12	Regulacija gena zone pelucide
FOXL2	3q23	Diferencijacija ćelija granuloze i razvoj folikula
SOHL1/2	13q13.3	Rana folikulogeneza
BMP-15	Zq11.2	Folikularno sazrevanje
GDF-9	5q23.2	Folikularno sazrevanje
INHA	2q33-36	Regulacija folikulogeneze putem FSH inhibicije
FSHR	2p21	Rast i razvoj folikula, steroidogeneza
LHR	2p21	Starenje folikula, steroidogeneza i ovulacija
ESR1	6q25.1	Rast i sazrevanje folikula

Obzirom na složenu etiologiju PPOI neke studije sugeriraju da varijacije broja kopija (CNVs) autozomnog gena mogu imati veći uticaj na razvoj PPOI od abnormalnosti X hromozoma, što se poklapa sa pojavom genske heterogenosti (68,69). CNVs –varijacije broja kopija su DNK regioni > 1kb koji se razlikuju po broju između pojedinaca i doprinose fenotipskoj varijaciji i osetljivosti na bolesti (70). Dva gena povezana sa autozomnim mikrobrisanjem su uključeni u popravke raspada dvostrukog lanca DNK u toku mejoze (SYCE1) i progresije mitotičke ćelije (CPEB1) (71). SYCE1

poremećaj dovodi do apoptoze ćelije kod miševa, dok CPEB1 poremećaji dovode do gubitka ovocita i samim tim i odsustvo folikula kod miševa (71). Ova dva gena su mogući kandidat geni za PPOI, gde smanjeni broj kopija može dovesti do ubrzanog procesa gubitka folikula i PPOI kod žena (71).

Analiza mikro-ribonukleinskih kiselina (miRNK) je jedna perspektivnih strategija nedavno primenjena na ispitivanje PPOI gena. miRNK je mala nekodirajuće pojedinačne RNK molekule, veličine oko 22-24 nukleotida, koji su uključeni u post-translacionoj regulaciji gena kroz represiju ili degradaciju specifičnih RNK target regiona (72). miRNK reguliše diferencijaciju ćelija, progresiju ćelijskog ciklusa i apoptozu. miRNK je familija regulatornih RNK koje deluju putem RNK interference, gde kompleks efektor miRNK i enzimi mogu degradirati informacionu RNK, blokirati je tako da ona ne može biti prevedena ili ubrzati proces njene degeneracije. Na miševima je pokazano da miRNK imaju ulogu u sazrevanju ovocita i folikulogenezi (73). Istraživači sugerišu da mir-22-3p može regulisati lučenje FSH hipofize, pokazano na modelu svinje, pri čemu smanjena ekspresija može doprineti patogenezi PPOI (74).

NGS (next generation DNA sequencing) - sledeća generacija metoda za sekvenciranje DNK) tehnologija omogućava analizu čitavog ljudskog genoma, analizu miliona baznih parova paralelno u celom egzomu ili genomu u jednoj reakciji (75). Uradjene su četiri studije kod srodnih porodica sa istorijom PPOI, kod kojih su nađene patogene varijante u genu za stromalni antigen 3 (STAG3) a identifikovane su promene u genima: HFM1, MCMB8 i MCM9 (76,77,78,79). Ovi geni su uključeni u replikaciju i popravku DNK, mejozu i stabilnost hromozoma. Tačani mehanizmi još nisu poznati, ali se predpostavlja da će akumulacija oštećenja DNK i nestabilnost hromozoma u jajniku dovesti do ubrzane atrezije folikula i PPOI (77).

1.3. KLINIČKA SLIKA

PPOI se manifestuje akutnim simptomima i znacima, kao i hroničnim komplikacijama. Tipični simptomi PPOI su: razdražljivost, preosetljivost, malaksalost, depresivnost, valunzi, česte promene raspoloženja, nezainteresovanost, loša koncentracija, nesаница, bolovi u kostima i zglobovima, suva koža, suvoća očiju i vagine, smanjenje seksualne želje.

Karakteristični znaci su: atrofični vaginitis, dizurija, recidivantne urinarne infekcije, vazomotorna nestabilnost i drugi.

U koliko se na vreme ne dijagnostikuje PPOI i ne započne sa odgovarajućom terapijom mogu se razviti hronične komplikacije od strane celog organizma, a posebno od kardiovaskularnog sistema i kostiju.

Mnoge studije su rađene u žena sa obostranom adnektomijom i dobijeni podaci ukazuju na to da hipoeestrogenija dovodi do bržeg razvoja kardiovaskularnih bolesti jer izostaje kardioprotektivni efekat estradiola. Svi navedeni simptomi i znaci su jače izraženi nego u žena kod kojih je urađena adnektomija u fiziološkoj menopauzi.

Beta estradiol povećava kontraktilnost srca, smanjuje perifernu vaskularnu rezistenciju, popravlja lipidni status (smanjuje holesterol i low density lipoprotein-LDL, a povećava high density lipoprotein-HDL), povećava endotelin, a smanjuje fibrinogen (80).

U hipoeestrogeniji gubi se elastičnost krvnih sudova, javlja se vazomotorna nestabilna angina uz moguću pojavu anginoznih tegoba i promene krvnog pritiska (81).

Važan organ na koji estradiol takođe ispoljava efekat je kost. Hipoeestrogenija u žena sa PPIO dovodi do pojave osteoporoze. Estradiol inhibiše produkciju citokina (interleukina 1, interleukina 6, gama interferona i tumorskog faktora nekroze TFN) i na taj način smanjuje razmnožavanje osteoklasta i razgradnju kostiju (82). Estradiol ima direktno dejstvo na kostnu ćeliju i na paratiroidni hormon (PTH) koji reguliše apsorpciju kalcijuma iz digestivnog trakta. Dejstvo estradiola preko „insulin like growth factor“ (IGF1) i hormona rastjenja nije još utvrđeno (83). Nakon 35 godine života i muškarci i žene gube 1% koštane mase godišnje (84). Taj gubitak koštane mase se ubrzava prve tri do četiri godine nakon ulaska u PPIO ili menopauzu. Žene sa PPIO imaju povećan rizik za osteoporozu:

- Ako imaju pozitivnu porodičnu anamnezu
- Uzimaju steroide duže od 6 meseci
- Amenoroične su duže od 6 meseci
- Ako su bivši alkoholičari
- Ako su duže vreme primale GnRH

1.4. DIJAGNOZA

Za postavljanje dijagnoze PPIO neophodno je uzeti detaljnu anamnezu, uraditi klinički pregled, kariotip (za žene mlađe od 30 godina), biohemijske i hormonske analize.

Tabela 3. Biohemijske i hormonske analize za PPOI

Biohemijske analize	Sedimentacija, hemogram, proteinogram, glikemija, jonogram, lipidi.
Hormoni	FSH, LH, E ₂ , AMH, Inhibin B, prolaktin, testosteron, progesteron, TSH, fT4
Antitela	Antinuklearna At, antiadrenalna At, antimikrozomalna At, antimitohondrijalna At, antitireoglobulinska At, antiparijetalna At, antiovarijumska At, antineutrofilna At, antikardiolipinska At, antiglatkomišićna At, antifosfolipinska At, antiDNA At i dr.

Potom se sprovode vizualizacione metode: ultrasonografski pregled male karlice, dojki, abdomena, mamografija i osteodenzitometrija(L2-L4).

Potvrda dijagnoze je FSH> 40IU/L i E₂<50pmol/L

Pored FSH i E₂, neophodnih za postavljanje dijagnoze, danas je moguće izmeriti AMH (AntiMüller-ov hormon) i inhibin. AMH sprečava nagli porast svih folikula. Ukoliko je nizak, značajno je smanjen broj preostalih folikula. Inhibin je u negativnoj korelaciji sa FSH. Određivanje AMH i inhibina se ne sprovodi rutinski.

Patohistološka dijagnoza

Na učinjenim biopreparatima ovarijuma u žena sa PPOI nema folikula već je nastala fibroza u čak 60% slučajeva. Međutim i ukoliko se u biopreparatu ne nađu folikuli u oko 10% slučajeva žene ih još imaju, što smanjuje značaj biopsije. U uzetom materijalu ne mora biti aktivnih folikula što ne znači da ih nema na drugom mestu na jajniku. Biopsija ovarijuma kod žena sa PPOI nije neophodna (85).

U 40% slučajeva PPIO nađen je veliki broj početnih folikula u jajnicima (85). Ovakav nalaz imaju pacijentkinje sa „Savage“ sindromom. Ovaj sindrom je dobio ime po prvoj pacijentkinji „Savage“ Jonesa i Moraesa (86). Sindrom „rezistentnih

ovarijuma“ se odlikuje prisustvom brojnih folikula, hipergonadotropizmom, hipoestrogenijom i hiporeceptibilnošću na velike doze egzogenih gonadotropina za indukciju ovulacije.

Tipična patohistološka slika podrazumeva smanjeni broj germinalnih ćelija, atretične folikule, T- limfocite, nešto manje B- limfocita, uz veliki broj makrofaga i plazma ćelija.

Etiologija sindroma nije poznata ali postoji nekoliko hipoteza (87):

1. Nedostatak receptora za gonadotropine ili estrogene
2. Poremećaj staze postreceptora
3. Imunološki faktori kao što su antitela na gonadotropinske receptore (88)

Limfocitarni ooforitis retko se nalazi kod pacijentkinja sa PPOI u odsustvu nadbubrežnog autoimuniteta i /ili Adisonove bolesti.

Muechler EK. i saradnici (89) pokazali su prisustvo imunoglobulina (IgA, IgG, IgM) u jajnicima koji nisu zahvaćeni ooforitisom. Hipotetično, antitela se nalaze u jajnicima ali nisu dostigla nivo na kojem mogu da se otkriju u serumu ili da indukuju lokalnu upalu. Histologija PPOI u odsustvu nadbubrežnog autoimuniteta / Adisonove bolesti ne doprinosi imunološkoj patogenezi bolesti. Ovo se odnosi i na atrofiju jajnika otkrivenu u većini slučajeva. Ona može da predstavlja završni stadijum autoimunog procesa protiv strukture jajnika ili završnog nestajanje oocita usled genetskih faktora.

1.5. TERAPIJA

Terapija se sastoji od supstitucije estro-progestagenima, koja se daje u većim dozama nego u menopauzi. Po nekim studijama nivo estradiola u serumu mora biti bar 300pmol/L da se ne bi javila osteoporoza (90).

Tabela 4. Neki efekti terapije estroprogestagenima

ESTRADIOL	<ul style="list-style-type: none">- Efekti na kardiovaskularni i koštani sistem, kožu, sluzokožu- Efekti na CNS (smanjuje nesanicu, depresiju, razdražljivost, poboljšava koncentraciju, povećava libido)
PROGESTERON	<ul style="list-style-type: none">- Stimuliše osteoplastnu aktivnost- Ima ulogu u remodeliranju kosti- Povećava mineralni sastav kosti- Ima vazokonstriktorno dejstvo (onemogućava prekomernu vazodilataciju indukovanu estrogenima)- Relaksantno dejstvo

Pravovremena terapija estro-progestagenima može dovesti u žena sa PPOI do 10% spontanih trudnoća ukoliko postoji još po neki folikul koji može da reaguje.

Terapija fertiliteta i terapija PPOI u budućnosti

U slučaju kada ne postoje folikuli spremni za oplodnju, postoji mogućnost uzimanja jajne ćelije od „donora ovocita“ i vantelesna oplodnja (IVF) žene sa PPOI. U tom slučaju mora se pravno i etički regulisati uzimanje jajne ćelije donora, tj. žena donor mora biti saglasna sa davanjem jajne ćelije kao i sa tim da neće tražiti pravo na dete iako je ona genetski majka (91). U ovakvim slučajevima mora se usaglasiti menstrualni ciklus donora i žene sa PPOIpa tek onda pristupiti IVF-u (93). U normalnoj trudnoći zigot nosi polovinu genetskog materijala od majke, dok kod ovakvih trudnoća zigot je kao strano telo, i često dolazi do imunološke reakcije i odbacivanja tj spontanog pobačaja. Kod jako mladih i neudatih žena koje su u riziku od APS i PPOI i krioprezervacija tkiva jajnika može dati nadu rešenju problema (93).

Terapija budućnosti je genska terapija kojom se ispravlja poremećaj gena koji je, u određenoj grupi, odgovoran za nastanak PPOI-a.

2. CILJEVI

1. Ispitati da li polimorfizmi mikrosatelitnih ponovaka u genima za estrogenski receptor alfa - ESR1(TA)_n, estrogenski receptor beta - ESR2(CA)_n, androgenski receptor - AR(CAG)_n, i AR(GGN)_n predstavljaju etiološki čini­lac u nastajanju PPOI-a kod žena iz Srbije.
2. Ispitati da li su polimorfizmi gena za ESR1 povezani sa PPOI kod žena iz Srbije.
3. Ispitati da li su varijante koje se nalaze u velikoj Han kineskoj kohorti-8q22.3 SNPs rs3847153 i rs 3108910 i po jedan SNP u HK3 (rs2278493), ESR1 (rs2234693) i BRSK 1 (rs12611091) povezane sa PPOI u srpskoj kohorti.
4. Ispitati da li varijante u SOHLH2 genu doprinose primarnoj prevremenoj insuficijenciji ovarijuma kod žena u različitim etičkim grupama.
5. Analizirati ima li razlike u vrednostima FSH, LH, estradiola (E2), prolaktina(Prl) i progesterona (Pg), BMI i godinama starosti ulaska u PPOI, kod žena iz Srbije sa PPOI i žena iz Srbije sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2 gena.
6. Ispitati odnos između COLIA1 genskog polimorfizma i indeksa mineralne gustine kostiju (BMD) kod žena iz Srbije sa PPOI-om.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Određivanje broja ponovaka u okviru mikrosatelitnih polimorfizama gena za ESR1(TA)_n, ESR2(CA)_n, AR(CAG)_n, i AR(GGN)_n žena iz Srbije

3.1.1. Selekcija ispitanika

Studija je obuhvatila etički homogenu populaciju žena iz Srbije istog socio-ekonomskog statusa i navika u ishrani. Ispitano je 196 žena sa dijagnozom idiopatskog POF-a. Kontrolnu grupu su činile 544 zdrave žene sa redovnim menstruacijama koje ne koriste hormonsku terapiju. Studija je izvođena na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog Centra Srbije između 2007. i 2010. godine. Sve pacijentkinje su odgovarale na pitanja o menstruaciji, paritetu, zastupljenosti PPOI-a u porodici, obrazovanju i eventualnom stresu pre amenoreje.

Diagnoza PPOI je postavljena kod žena koje su ispunile kriterijume: amenoreja duža od 12 meseci pre 40-te godine života, FSH >40IU/L i estradiol < 50 pmol/L. Sve pacijentkinje su imale nizak nivo inhibina B i AntiMüllerian hormona (AMH). Žene koje su imale ginekološke operacije (histerektomije, ovarijske operacije), one sa istorijom zloupotrebe lekova i droge, kao i one sa poznatim stanjima koje izazivaju disfunkciju jajnika (metabolički poremećaji), autoimune bolesti, zračenje ili hemoterapija bile su isključene iz istraživanja. Pored toga sve žene sa dijagnozom PPOI uključene u ovu studiju imale su normalne rezultate za sledeće: krvna slika, glukoza i profil lipoproteina, prolaktin, testosteron, androstenedion, DHEA sulfat, 17-OH progesteron, tiroksin, tiroidni stimulirajući hormon (TSH), paratiroidni hormon, adrenokortikotropni hormon i kortizol. Ispitivane pacijentkinje su imale negativan nalaz za antiovarijumska antitela, antikardiolipinska antitela, antitireoglobulinska antitela i antimikrosomalna antitela. Sve žene sa PPOI-om uključene u studiju bile su mlađe od 40 godina i imale su normalan kariotip. Sonografski pregled male karlice kod svih pacijentkinja pokazao je da nema patoloških promena jajnika ili folikularne aktivnosti. Sve žene uključene u ovu studiju potpisale su pismeni pristanak koji je odobren od strane lokalnog odbora za etiku u Beogradu. Genetska ispitivanja radjena su na University Hospital of Leicester, u Leicesteru u Engleskoj.

3.1.2. Genotipizacija mikrosatelitnih ponovaka

Genomska DNK je ekstrahirana iz pljuvačke korišćenjem Oragene®OG-300 kompleta za uzimanje uzorka DNK (DNA Genotek., Kanada), sledeći protokol proizvođača. Mikrosatelitni markeri pojačani su pomoću konvencionalne lančane reakcije polimeraze (PCR), korišćenjem fluorescentno obeleženih Sigma, UK.

Genotipizacija ESR1(TA)_n i ESR2(CA)_n polimorfizma sprovedena je PCR pojačavanjem u ukupnom obimu od 10 µl koji sadrži 10 ng DNK za ESR1(TA)_n ili 2ng DNK za ESR2(CA)_n nakon optimizacije, 0.25mM svaki dNTP, 1.5mM MgCl₂, 0.5U Taq DNA Polimeraze (KAPA Biosystems, USA), i 0.4µM svakogosnovnog niza.

Mi smo kreirali sledeći prajmer 5'-6FAM-TTAGGCTGCAGCfukAGGAAG-3' i obrnuti prajmer 5'-TGTTACATTGTCGGTCTTGGTC-3' za ESR1 (TA)_n i

5'-HEKSSGGTCTGTACCCAGGTGTGTG-3' i obrnuti prajmer

5'-TCAGGCTTGTCTCGAACTCC-3' za ESR2(CA)_n analize. Temperatura je bila 95°C tokom 5 minuta, zatim 30 ciklusa na 95°C, zatim na 62°C tokom 30 sekundi, 72°C tokom 20 sekundi, i završna inkubacija na 72°C u trajanju od 2 minute.

Genotipizacija za AR(CAG)_n i (GGN)_n polimorfizam je izvedena pomoću PCR u ukupnoj zapremini od 10µl sa sadržajem od 10 ng DNK za AR(CAG)_n ili 2ng DNK za AR(GGN)_n. Posle optimizacije, 0.3mM svakog dNTP, 2.0mM MgCl₂, 0.2U visokopouzdanane Hotstart DNA Polimeraze (KAPA Biosvestems, USA) i 0.3µM svakog od prajmera. Kreirali smo prajmer 5'-Hek-AGATTCAGCCAAGCTCAAGG-3' i obrnuti prajmer 5'-CTCATCCAGGACCAGGTAGC-3' za ponavljanja CAG i prajmer 5'-6FAMCTCTTCACAGCCGAAGAAGG-3', odnosno obrnuti prajmer 5'-GGATAGGGCACTCTGCTCAC-3' za GGN ponovljenu analizu. Temperatura je bila 95°C tokom 5 minuta, a nakon toga 30 ciklusa 98°C 20 sekundi, zatim na 60°C tokom 15 sekundi, i završna inkubacija na 72°C tokom 5 minuta.

Za određivanje dužine fragmenata, 1.0µl PCR proizvoda je pomešano sa 0.2µl MapMarker ® 1000-ROX (Bio Ventures Inc. USA) i sa 9.8µl ultra čistim formamidom (AGTC Bioproduct Ltd, Velika Britanija). Posle denaturacije posle 5 minuta na 96°C i hlađenja od 5 minuta na ledu, uzorci su testirani na ABI 3130xl genetskom analizatoru

(Applied Biosystems, USA) a ponovljene dužine su kasnije proveravane i dodeljene u softveru Genemapper (verzija 4.0, Applied Biosystems).

3.1.3. Kontrola kvaliteta

Jedan anonimni genomski DNK uzorak i reakcija bez DNK (negativna kontrola) su uključeni u svaki set PCR amplifikacije i za svaki eksperiment održivanja mikrosatelitskih dužina, kao pozitivna i negativna kontrola, respektivno. To osigurava konzistentnost poziva alela između PCR serija. Dodatno, 10% uzoraka bilo je nasumice odabrano i ponavljano je određivanje dužina kako bi se utvrdila reproduktivnost. Kako bi se potvrdio tačan broj ponavljanja, 16PCR produkata različitih veličina, određeno Genemapper analizom, podvrgnuti su direktnom sekvenciranju na Applied Biosystems 3730 sekvenceru (Applied Biosystems, USA). Ponovljene dužine merene sekvenciranjem su uspešno povezane sa odgovarajućim položajima vrhunaca utvrđenih fluorescentnim određivanjem genotipa zasnovanim na dužini.

3.2. Određivanje povezanosti između polimorfizama gena za ESR1 i PPOI kod žena iz Srbije

3.2.1. Selekcija ispitanika

Studija populacije se sastoji od etički homogenih žena iz Srbije istog socio-ekonomskog statusa i navika u ishrani. Ispitivano je 197 srpskih žena sa PPOI koje su uklopljene sa 547 kontrolnih. Ispitanice su bile regrutovane od strane Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog Centra Srbije u period od 2007-2010.godine. Sve pacijentkinje odgovarale su na pitanja o poslednjoj menstruaciji, broju porođaja i pobačaja, porodičnoj istoriji PPOI, obrazovanju i stresu koji je eventualno predhodio amenoreji.

Dijagnoza je postavljena na osnovu četiri kriterijuma: sve žene su bile mlađe od 40 godina kada je nastupila amenoreja koja je bila duža od 12 meseci, $FSH \geq 40 IU/L$ i $E_2 < 50 pmol/L$. Žene koje su imale ginekološke operacije (histerektomije, cistektomije jajnika ili ovarijektomije), koje su upotrebljavale droge i one sa poznatim stanjima koje izazivaju disfunkciju jajnika (metabolički poremećaji-galactozemija, autoimuni poremećaji, zračenje, hemijoterapija) bile su isključene. Sve žene sa PPOI koje su bile

uključene u studiju imale su normalne sledeće analize: krvna slika, profile glukoze i lipoproteina, prolactin, testostosterone, androstenedion, dehidroepiandrosteron sulfat, 17-hidroksiprogesteron, tiroksin, tireostimulišući hormone, hormone paratiroidne žlezde, adrenokortikotropni hormone i kortizol. Sve pacijentkinje sui male niske vrednosti Inhibina B u serumu (srednja vrednost±standardna devijacija 5.9±14.93) i nivoe anti-mullerian hormona (0.03±0.069). Pacijentkinje su takođe bile negativne na anti-ovarijumska antitela, anti-kardiolipinska, anti-tireoglobulinska i anti-mikrozomalna antitela. Sve ispitanice sa PPOI sui male normalan kariotip. Ultrasonografski nalaz kod svih pacijentkinja sa PPOI nije pokazao patologiju jajnika ili folikularnu aktivnost.

U kontrolnoj grupi je bilo 547 zdravih žena sa redovnim menstruacijama koje ne koriste nikakvu hormonalnu terapiju.

Sve žene uključene u ovu studiju potpisale su pismeni pristanak koji je odobren od strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta u Beogradu. Genetska ispitivanja radjena su na University Hospital of Leicester, u Leicesteru u Engleskoj.

3.2.2. Analiza genotipa

Genomska DNK je izolovana iz pljuvačke korišćenjem Oragene OG-300 DNA kompleta za prikupljanje uzoraka DNK (DNA Genotec Inc., Kanada) prema protokolu proizvođača. Dva SNP, Pvu II i Xba, locirana u intronu 1 ESR1 su genotipovani dinamičkom alel-specifičnom hibridizacijom (DASH) (94,95). Prajeri korišćeni za PCR amplifikaciju koraka DASH analize bilisu:

5´BiotinCATCAGTTCATCTGAGTTCCAA3´,

5´CACTCAGGGTCAATGGGAAACA3´(PvuII)i

5´BiotinCAGAACCATTAGAGACCAATGC3´,

5´TGCTTTGTCTATGTTTCCCAGA3´(Xba I). Probe korišćenja za DASH su bile

5´CATAAAACGGCTGGGAC3´ ROX (Pvu II) i 5´TGTGGTCTGGAGTTGGG3´

ROX (Xba I). Za pacijente heterozigotne za obe varijante, haplotipovi su određivani digestijom restrikcionih enzima PCR proizvoda koja je obuhvatila dve restrikcione lokacije, zatim elektroforezom na agarozu gelu (PCR-RFLP).

Ukratko, 809-bp DNK fragment koji obuhvata dve polimorfne lokacije je amplifikovan pomoću prednjeg i zadnjeg prajmera 5´TTTCACGCAGTCTGGAGTTG3´ i 5´GCAAAACATGCACTCTCTGG3´

respektivno. PCR je obavljena korišćenjem standardnih uslova i zaokruženi broj amplifikovane DNK u zajedničkoj digestiji sa restrikcionim endonukleazama Pvu II i Xba I (Fermentas, UK). Digestovane DNK zatim su podvrgnute elektroforezi u 2%(w/v) agarozu. Nastali fragmenti DNK omogućavaju nedvosmisleno bodovanje pojedinih genotipova ili bodovanje četiri moguća haplotipa. Prisustvo Pvu II lokacije odgovara T alelima i prisustvo Xba I lokacije odgovara A alelima, odgovarajućeg SNP. Prema konvenciji, odsustvo restrikcionih mesta enzima takođe mogu biti označena sa velikim slovima (P ili X), a prisustvo sa odgovarajućim malim slovima (p ili x). P i p odgovaraju C i T alelima u Pvu II SNP; X i x odgovaraju G i A alelima Xba I SNP(Slika broj 2).



Slika br.2 ESR1 SNP haplotipovi utvrđeni digestijom restrikcionim enzimima sa Pvu II i Xba I.

Haplotipovi su prikazani u smislu alelnih baza prisutnih na svakoj od dve varijante lokacija. Prisustvo (p ili x) ili odsustvo (P ili X) restrikcionih mesta enzima takođe su prikazani u zagradama.

3.3. Ispitivanje varijanti koje se nalaze u velikoj Han kineskoj kohorti-8q22.3 SNPs rs3847153 i rs 3108910 i po jedan SNP u HK3 (rs2278493), ESR1 (rs2234693) i BRSK 1 (rs12611091) i njihove povezanosti sa PPOI kod žena iz Srbije

3.3.1. Selekcija ispitanika

Po dizajnu ovo je “Case –control” studija genetskih udruženja kod 197 PPOI slučajeva i 552 kontrolnih. Proučavali smo 197 nepovezanih žena iz Srbije sa

idiopatskom PPOI i 552 kontrolne kako bi utvrdili značaj nalaza ostvarenih u studiji Kineskih PPOI uzoraka (96).

Kriterijumi za uključivanje u studiju bili su prestanak menstruacionog ciklusa pre 40-te godine starosti, najmanje dve vrednosti seruma FSH koncentracija preko 40 IU/L i estradiol ispod 50 pmol/mL. Porodična istorija pokazala je da nema neobjašnjive mentalne zaostalosti u prvom i drugom kolenu srodstva kao ni sindroma ataksija – tremor, koje bi mogle da ukažu na premutaciju FMR1. CGG ponovci nisu ispitivani kako bi se definitivno isključila premutacija FMR1. Žene sa poznatim hromozomopatijama, ovarijektomijama, hemioterapijama ili radioterapijama bile su isključene iz studije. Svi pacijenti su testirani na autoimunu etiologiju. Radjena su antitela: antiovarijumska antitela, antikardiolipinska, antitireoglobulinska i antimikrozomalna. Rezultati bili u granicama normale. Kontrolna grupa je obuhvatala 552 zdrave žene sa redovnim menstruacijama i normalnim koncentracijama FSH (<10IU/L). Svim ženama je urađen ultrasonografski pregled male karlice kako bi se potvrdilo prisustvo materice, prisutnost i morfološki status jajnika, osustvo neočekivanih objašnjenja za amenoreje (naprmer neoplazija), i broj antralnih folikula. Jajnici su sonografski ispitani još 2-4 dana menstrualnog ciklusa pri čemu se broj folikula ≥ 5 , smatra normalnim. Pristanak je dobijen od svih ispitanica. Studija je odobrena od strane institucionih odbora za pregled Univerziteta u Beogradu i reproduktivne medicine Univerziteta Šandong. Genetska ispitivanja radjena su na University Hospital of Leicester, u Leicesteru u Engleskoj.

3.3.2. Analiza genotipa

DNK je uzeta od pacijenata sa PPOI i od kontrolne grupe pomoću Oragene DNK kita za prikupljanje uzoraka (DNA Genotek). Topljenje visoke rezolucije (HRM) korišćeno je kako je ranije navedeno (97) i predhodilo je direktnom sekvenciranju. PCR-HRM je izveden na Roche LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science). Proizvodi PCR su sekvencionirani na ABI 3730 DNK analizatoru sa BigDiy Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitom (Applied Biosystems).

3.4. Doprinos varijanti u SOHLH2 genu primarnoj prevremenoj insuficijenciji ovarijuma kod žena u različitim etičkim grupama

3.4.1. Selekcija ispitanika

Ukupno je ispitano 561 žena sa PPOI. Populaciju Han Kineskinja činile su 364 žena iz Srbije 197 žena. Pacijentkinje su bile iz Centra za reproduktivnu medicinu, Šandong Pokrajinske bolnice Šandong Univerziteta, Jinan, Kina i Klinike za endokrinologiju Kliničkog Centra Srbije, Univerziteta u Beogradu, Srbija, respektivno. Sve žene su bile ispitivane na varijante u SOHLH2 genu. Kriterijumi za uključivanje su bili sledeći: sekundarna amenoreja najmanje 6 meseci pre 40-te godine starosti, sa najmanje dve serumske FSH koncentracije veće od 40 IU/L. Smatralo se da postoji pozitivna porodična istorija ukoliko je još neka žena iz prvog ili drugog kolena imala PPOI. Žene sa kariotipskim abnormalnostima od predhodne hemio/radio- terapije, žene nakon hiruške intervencije na ovarijumima ili žene sa autoimunim bolestima za koje se zna da izazivaju PPOI bile su isključene. Istražene su prateće somatske anomalije (neurosenzorna gluvoća, blepharophimosis, cerebellar ataxia...), naročito ako su bile povezane sa poznatom sindromskom PPOI. Svi slučajevi sa prisutnim somatskim anomalijama su isključeni iz studije. Etički uparene zdrave žene, sa redovnim menstruacijama, normalnim nivoima hormona estrogena i gonadotropina, urednim sonografskim nalazom ovarijuma, bile su kontrolna grupa. Kontrolna grupa je obuhvatala 400 kineskih žena i 200 srpskih žena. Pisani pristanak dobijen je od svih ispitanica. Studiju je odobrio Etički odbor za razmatranje Centra za reproduktivnu medicinu Univerziteta u Beogradu. Genetska ispitivanja radjena su na University Hospital of Leicester, u Leicesteru u Engleskoj.

3.4.2. Analiza genotipa u sekvenci SOHLH2 gena

Genomska DNK je ekstrahovana iz uzoraka periferne krvi korišćenjem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) i Oragene kit skupljanje DNK (DNA Genotek). Celokupna kodirajuća sekvenca i intron-egzon granice SOHLH2 gena (NG_033786.1) je amplifikovana sa PCR. Sekvenciranje je izvedeno na ABI3730xI DNK analizatoru (Applied Biosystems, Foster City, CA) sa Big Dye Tem 1 inator v 3.1 Cycle Sequencing kitom (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Nove identifikovane varijante su potvrđene dvosmernim sekvenciranjem iz još dva nezavisna PCR proizvoda. Opisi

identifikovanih varijanti su urađeni u skladu sa Društvom za ljudsku varijaciju genoma (Human Genome Variation Society) (HGVS, www.hgvs.org/mutnomen). Prajmeri su navedeni u Tabeli br 5.

Tabela br 5. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju i sekvencioniranje SOHLH2 gena

Prajmer	Sekvenca	Veličina
E01-F	GCTAGTGACGCGGTCTCCTAA	451
E01-R	ATTCGCTCCCCACAGTTCC	451
E02-F	TCCTTGAGCTGCTTATAGTTGACC	491
E02-R	TGGCCCCCTCAATTTGAAAAG	491
E0304-F	TCCTCACTGATTTGAGATGCTACTT	543
E0304-R	CCAGGTAAAGAATACATATTTCTCCC	543
E05-F	GCATTAAGGATTGGGGCTTGT	385
E05-R	CCTGTTCCCTGTGGTCAAG	385
E06-F	CCTTTGTTTAGTGTATTGGTGCG	345
E06-R	AAGGCTGAATGAGTGAGTGGC	345
E0708-F	GGAAGTGTGTTTGTCTTTGGGTA	575
E0708-R	CCCTGCACTTTCCTGTGGATA	575
E09-F	TCCTAAGGAATTATCGTGGGTCA	386
E09-R	GGATTCCCTGGTTATGGTGGT	386
E10-F	AATAGCGGGCAGTTTATGTCTG	445
E10-R	CAGCCTTCCAACCAGAGTAGC	445
E11-F	GGGTTTTGTTGAATTGTTGTGAG	407
E11-R	TCGCTGCTGGTCTTTCTATCTG	407

In- silico predikcija

Poređenja sekvence SOHLH2 proteina među sisarima su vršena pomoću ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>).

Za procenu mogućih funkcionalnih efekata aminokiselinskih varijanti korišćen je Poly Phen-2v.2.2.5 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) i SIFT (<http://sift.jcvi.org/>).

Da bi se procenili mogući funkcionalni efekti varijanti sekvenci na spajanje RNK, korišćeni su sledeći alati: Exonic varijante su analizirane na moguće poremećaje pojačivača i prigušivača mesta uplitanja (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE>) sa RSCUE-ESE i ESE finder v.3.0 v.I.O PESX (<http://cubweb.biology.columbia.edu/pesx/>).

Intronik varijante su analizirane korišćenjem:

Splice Site Finder (<http://violin.genet-sickkids.on.ca/~ali/splicessitefinder.html>),

NNSPLICE V0.9 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html),

NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>), i

Human Splicing Finder v.2.4.1 (<http://www.umd.be/hsf/>).

3.5. Karakteristike žena iz Srbije sa PPOI i različitim varijantama SOHLH2 gena

3.5.1. Selekcija ispitanika

Studija je obuhvatila etički homogenu populaciju žena iz Srbije istog socio-ekonomskog statusa i navika u ishrani. Ispitano je 168 žena sa dijagnozom idiopatskog PPOI. Pacijentice su bile okupljene od strane Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog Centra Srbije između 2007 i 2010. godine. Sve žene sa PPOI uključene u studijusu bile su mlađe od 40 godina i imale su normalan kariotip. Od 168 žene, njih 9 je imalo jednu od varijanti SOHLH2 gena koje su nađene kod srpskih žena u prošloj studiji. Žene smo podelili u dve grupe. Prvu grupu su činile 159 žene sa PPOI, a drugu je činilo 9 žena sa PPOI koje su imale neku od varijanti SOHLH2 gena koje su nađene kod srpskih žena u predhodnoj studiji.

3.5.2. Laboratorijske analize

Svim ženama su uradjene hormonske analize, izmerena težina, visina i uzeta anamneza o godinama starosti pri ulasku u PPOI. Pisani pristanak dobijen je od svih ispitanica. Studiju je odobrio Etički odbor za razmatranje Centra za reproduktivnu medicinu Univerziteta u Beogradu.

3.6. Odnos između COLIA1 genskog polimorfizma i indeksa mineralne gustine kostiju (BMD) kod žena iz Srbije sa PPOI-om.

3.6.1. Selekcija ispitanika

Istraživanje je sprovedeno na grupi od 66 žena sa PPOI koje su bile upućene na kliničku procenu na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog Centra Srbije (KCS), Beograd u periodu od 2007-2010. godine. Grupa je bila etički homogena, istog socio-ekonomskog statusa i sa istim navikama u ishrani.

Detaljna medicinska istorija je dobijena od svake žene i njen dijetetski unos kalcijuma je određen pomoću sekvencijalnog upitnika koji je obuhvatio procenu hrane za potrebe kalcijuma u ishrani. Kriterijumi za odstranjivanje iz grupe su bili BMI > 30kg/m², obostrana ovarijektomija, upotreba lekova koji utiču na metabolizam kostiju (glukokortikoidi, tiroksin, bifosfonat, supstitucionna hormonska terapija). Žene sa obolenjima bubrega, jetre, endokrinim bolestima, reumatoidnim artritismom, malignitetom, dužom imobilizacijom i alkoholičarke su isključene. Dijagnoza PPOI-a je napravljena prema uzrastu (<40 godina), dužini amenoreje (>12 meseci) i prema vrednostima dva seruma folikostimulirajućeg hormona FSH>40IU/L i 17βestradiol<50pmol/L. Osteoporoza je dijagnostikovana prema T-skoru koji je jednak ili veći od – 2.5SD koristeći denzitometrijsku analizu na osnovu kriterijuma utvrđenih od strane Svetske zdravstvene organizacije (98).

Etički odbor Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS, Beograd, je odobrio ovu studiju. Svaka žena je potpisala pismeni informativni pristanak da učestvuje u studiji.

3.6.2. Biohemijska i genetska ispitivanja

Svaka žena je klinički ispitana i rutinski su urađena biohemijska ispitivanja kako bi se isključile sistemske i metaboličke bolesti kostiju. Merenja serumskog hormona, sprovedena u dva uzastopna dana u 8.00h nakon gladovanja preko noći, uključila su FSH, lutenizirajući hormon (LH), prolaktin, estradiol, progesteron i testosteron. Analize hormona su urađene od strane RIA koristeći standardni kit (INEP, Zemun, Srbija).

BMD je meren u lumbalnom delu kičme (L₁- L₄) rendgen apsorpciometrijom sa dvostrukom energijom (DEXA) koristeći lunar DPX-L denzitometar (Lunar Co, Madison, WI). Koeficijent varijacije in vitro CV=1.0% je procenjen na osnovu 300 dnevnih fantomskih merenja kičme. Težina i visina su merene neposredno pre merenja koštane gustine. BMD je predstavljen u g/cm². T – skor je izračunat na osnovu merenja izvršenom na lokalnom stanovništvu. Z- skor je izveden iz kontrolnih starosno-uparenih grupa.

DNK analiza je izvedena kod svih ispitanica. Genska ispitivanja radjena su na University Hospital of Leicester, u Leicesteru u Engleskoj.

Genomska DNK je ekstrahovana iz leukocita periferne krvi pomoću standardne fenol- hloroform procedure i analizirana elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Skrining postupak baziran na PCR/SSCP je upotrebljen za utvrđivanje polimorfizma u promotoru COLIA1. Oligonukleotid primarni set je kreiran da se dobije udeo PCR fragmenta od 160bp.

Uzvodni prajmer je 5'-GAGTGGCTTGCGTGGTAGAG-3', a nizvodni prajmer 5'- ACATTTCAAGTCTTGGGGGG-3'. PCR je izveden u konačnoj zapremini od 25ml koja sadrži 200ng DNK i 1U Stoffel Taq polimeraze (Perkin Elmer) na Techne Genius Termocycler sistemu. PCR protokol je 30 ciklusa po 1min na 96°C i 2 minute na 72°C , završni je izveden na 94°C tokom 2 minute. PCR proizvodi su analizirani elektroforezom na 2% agaroznom gelu i rastvoreni sa 18% poliakrilamidnim gelom sa 5% glicerola. Veze na gelu su vizualizovane bojenjem srebrom.

3.7. STATISTIČKA ANALIZA

Za mikrosatelitne polimorfizme gena za receptoregonadnih steroidakod srpskih žena sa PPOI-om, ponavci za ESR1(TA)_n, ESR2(CA)_n, AR(CAG)_n i AR(GGN)_n su klasifikovani i kao kontinuirane i kategoričke varijable, odvojeno. Za kontinuirane promenljive analize, frekvence alela su sumirane putem srednje i standardne devijacije (SD). Kako ne postoji ni jedna hipoteza o tome koji bi aleli bili povezani sa PPOI, dvorepi Student-ov T-test je korišćen za poređenje frekvence alela između pacijentkinja sa PPOI i kontrolne grupe.

Pored toga, genotip je takođe klasifikovan korišćenjem srednje dužine ponavljanja u kontrolnoj gupi za izostavljanje (99,45), gde je mikrosatelitno ponavljanje alela kodirano kao dugo ponavljanje (označeno sa L) i kratko ponavljanje (označeno sa S). Kao rezultati toga, tri klase genotipa mogu biti definisane za svaku od četiri STRs: LL, LS i SS. Granice za izostavljanje su 17 (S<17; L ≥17) za ESR1(TA)_n, 23(M<23; L ≥23) za ESR2(CA)_n, 22(S<22; L ≥22) za AR(CAG)_n i 23 (S<23; L ≥23) za AR(GGN)_n. Poređenje raspodele genotipa između ispitivane i kontrolne grupe je zatim sračunato pomoću logičnog regresionog modela. Odnos šansi (OR) je izračunat logičkom regresionom analizom sa intervala poverenja od 95% (CIs). Svi statistički rezultati sa P vrednošću manjom od 0.05 su smatrani statistički značajnim.

Za utvrđivanje postojanja veze između polimorfizama gena za ESR1 i PPOI kod srpskih žena, analize halotipa su izvedene metodom restrikcionih dužina fragmenata polimorfizma. SNP i halotipni efekti su bili analizirani logističkom regresijom modela. Sve analize su dvorepe a vrednost $p < 0.05$ smatrana je statistički značajnom.

Za utvrđivanje da li su varijante koje se nalaze u velikoj Han kineskoj kohorti-8q22.3 SNPs rs3847153 i rs 3108910 i po jedan SNP u HK3 (rs2278493), ESR1 (rs2234693) i BRSK 1 (rs12611091) povezane sa PPOI u srpskoj kohorti, korišćen je Fišerov egzaktni test (dvorepi) za testiranje Hardy-Weinberg ekvilibrijum (HWE) i razlika u frekvenciji alela. Vrednost $p < 0.05$ je smatrana statistički značajnom. Šanse alelnih odnosa (allelic odds ratio-OR) su izračunate.

Za nove varijante u SOHLH2 genima kod kineskih i srpskih žena sa PPOI, korišćen je Chi-square test ili Fišerov egzaktni test za poređenje razlika distribucije genotipa i frekvencije alela. P vrednost manja od 0.05 je smatrana statistički značajnom.

Za karakteristike srpskih žena sa PPOI i različitim varijantama SOHLH2 gena, za analizu primarnih podataka korišćene su deskriptivne statističke metode, metode za testiranje statističkih hipoteza i metode za ispitivanje zavisnosti.

Od deskriptivnih statističkih metoda korišćene su mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana), mere varijabiliteta (standardna devijacija) i relativni brojevi (pokazatelji strukture).

Od metoda za testiranje statističkih hipoteza korišćeni su: t-test i Mann Whitney U test.

Od metoda za analizu zavisnosti upotrebljen je Pearsonov koeficijent linearne korelacije.

Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 0,05.

Za kolagen Tipa I Alfa1 genskog polimorfizma kod srpskih žena sa PPOI-om, parametri raznih genotip grupa su upoređeni korišćenjem Kruskal-Wallis ANOVA testa. Chi-kvadrat test je korišćen za poređenje raspodele kategorijskih kliničkih podataka. Analize korelacije su izvedene korišćenjem Spearman testa. Hardy-Weinberg ravnoteža je takođe testirana od strane Tools za populaciju, genetska analiza programom

metode Monte Carlo sa 40 000 slučajnih permutacija (100). Svi proračuni su izvedeni sa SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Statistički značajnom se smatrala p-vrednost $<0,05$.

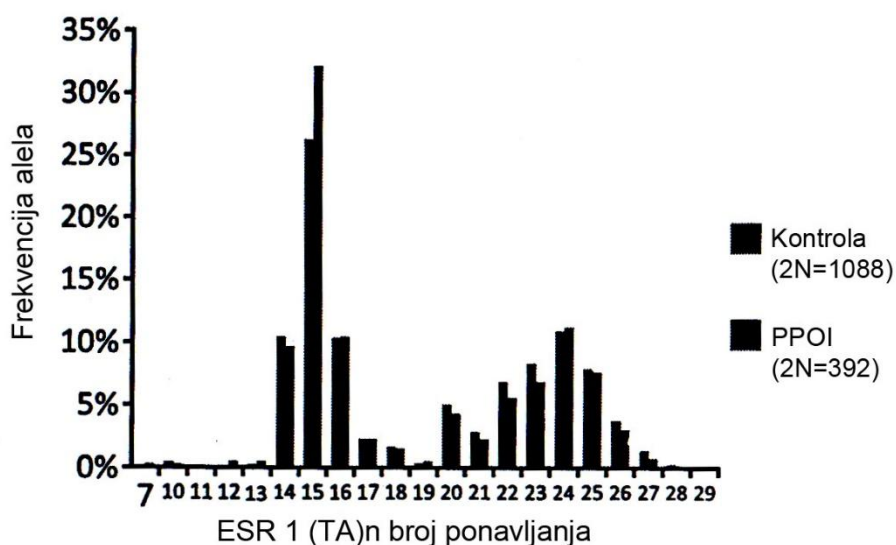
4. REZULTATI

4.1. Ispitivanja mikrosatelitnih polimorfizama gena za receptore gonadnih steroida kod žena iz Srbije sa PPOI

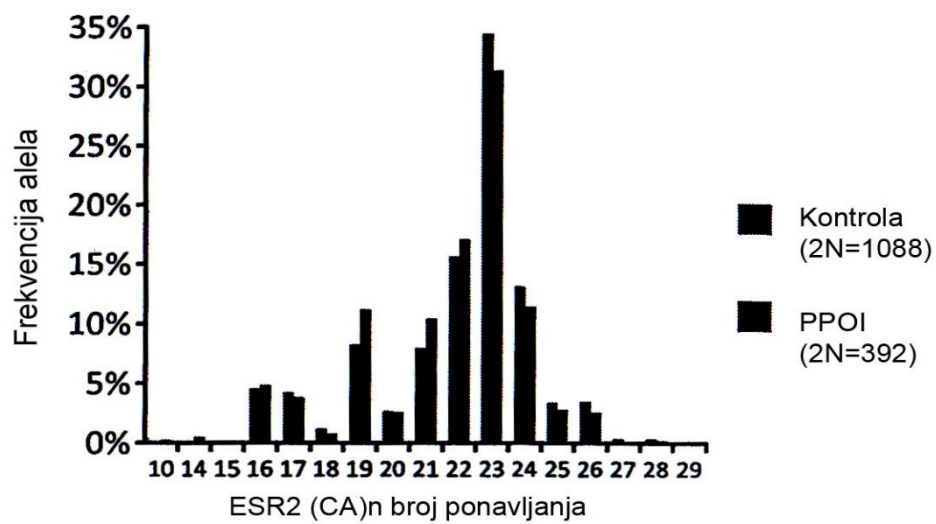
4.1.1. Distribucija alela svakog pojedinačnog mikrosatelita ESR1(TA)_n, ESR2(CA)_n, AR(CAG)_n i (GGN)_n između 196 ispitanica sa PPOI-om i 544 kontrolnih

Distribucija alela svakog pojedinačnog mikrosatelita ESR1(TA)_n, ESR2(CA)_n, AR(CAG)_n i (GGN)_n između 196 ispitanica sa PPOI-om i 544 kontrolnih je prikazana na sledeća četiri grafikona (Grafikon 1- 4).

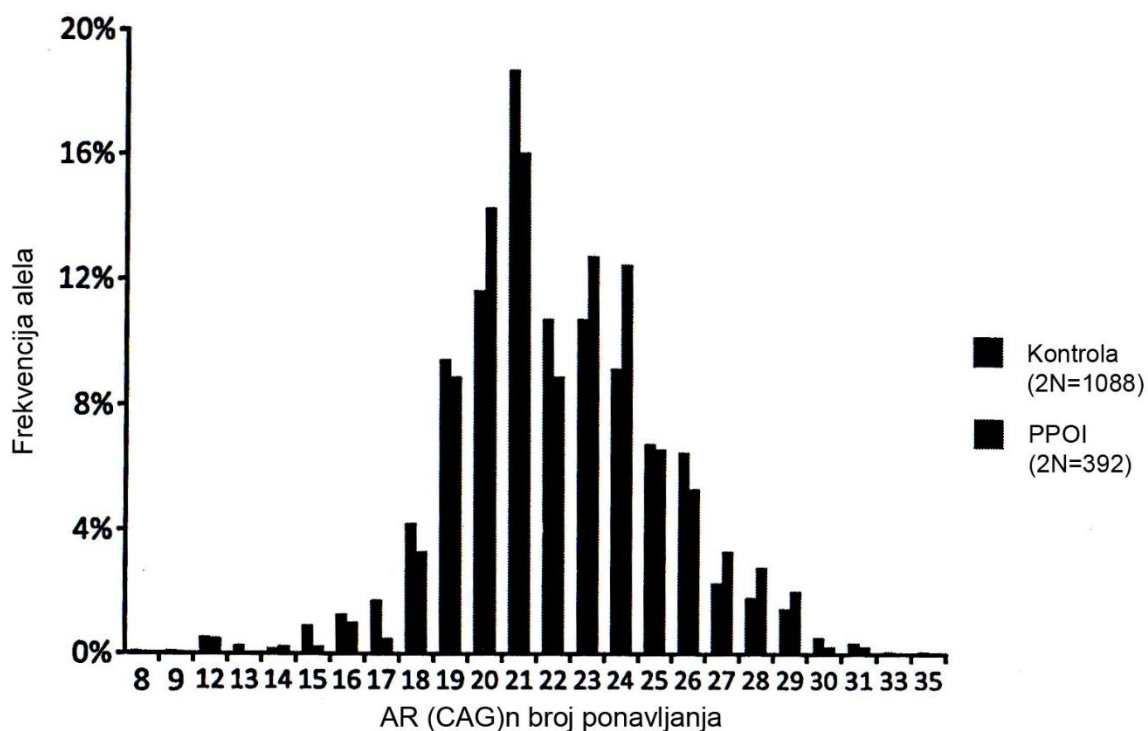
Grafikon br. 1. Frekvencija alela mikrosatelita ESR1(TA)_n



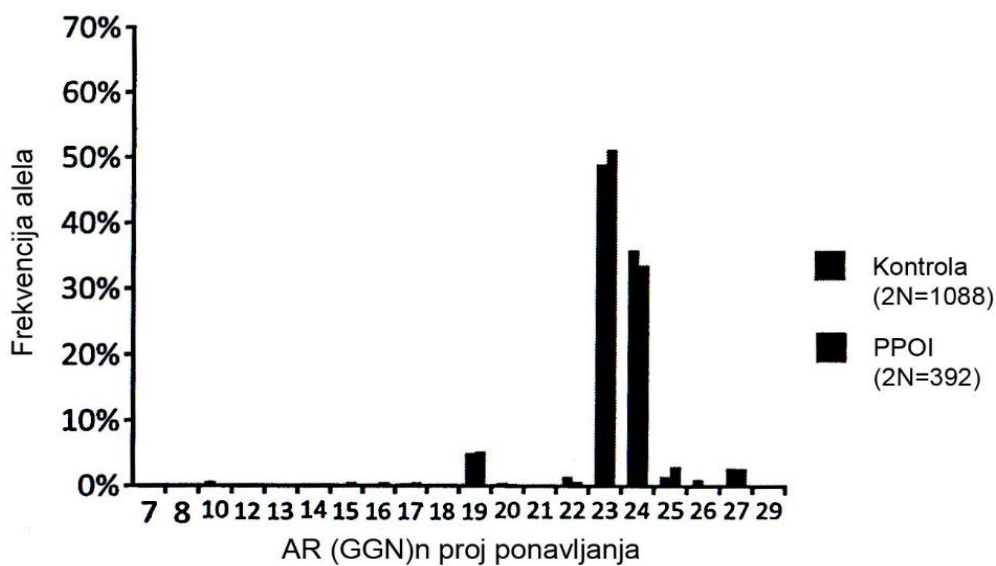
Grafikon br. 2. Frekvencija alela mikrosatelita ESR2(CA)n



Grafikon br. 3. Frekvencija alela mikrosatelita AR(CAG)n



Grafikon br. 4. Frekvencija alela mikrosatelita AR(GGN)n



4.1.2. Dužina ponovaka u ESR1

ESR1 - Dužina ponovaka u ESR1 kretala se od 7 do 27 sa srednjom dužinom od 16 kod ispitanica sa PPOI-om i od 10 do 29 sa srednjom dužinom od 17 u kontrolnoj grupi. Ovaj polimorfizam pokazuje bi-modalnu distribuciju, sa pikovima kod 15 ponovakai 24 ponovaka (Grafikon 1,2,3,4). Razlika u raspodeli frekvencije ponovaka TA di-nukleotida na ESR1 genu između 196 ispitanica sa PPOI-om(392 hromozoma) i 544 kontrolnih (1088 hromozoma) bila je na granici značaja ($p=0.059$) (Tabela br.6). Ispitanice sa PPOI-om pokazuju tendenciju kraćih ponavaka, ali razlika nije statistički značajna u (TA)n ponavku genotipne distribucije (SS, SL, LL) između dve grupe ($p=121$), (Tabela br.6).

Tabela br. 6. Rezultati analize mikrosatelitnih polimorfizama gena za ESR1, ESR2 i AR kod ispitanica sa PPOI-om i kontrolne grupe

MIKROSATELITI	NIZ	SV±SD	P
ESR1(TA)n			
PPOI(n=196)	7-27	18.56±4.33	0.059
Kontrole (n=544)	10-29	19.05±4.39	
ESR2(CA)n			
PPOI(n=196)	14-32	21.67±2.48	0.034
Kontrole (n=544)	19-33	21.97±2.43	
AR(CAG)n			
PPOI(n=196)	12-31	22.29±2.93	0.071
Kontrole (n=544)	8-35	21.96±3.13	
AR(GGN)n			
PPOI(n=196)	7-29	23.06±2.08	0.620
Kontrole (n=544)	7-29	23.12±2.03	

ESR1 – estrogenski receptor alfa; ESR2 – estrogenski receptor beta; AR- androgenski receptor; PPOI-primarna revremena ovarijalna insuficijencija, SV-srednja vrednost, SD-standardna devijacija

4.1.3. Dužina CA ponovaka u ESR2

ESR2 - Dužina CA ponovaka ESR2 kretala se od 10 do 28 sa srednjom dužinom od 22 kod ispitanica sa PPOI-om i od 15 do 29 sa srednjom dužinom 23 u kontrolnoj

grupi. Prosečan broj (CA)n ponavaka je bio manji kod ispitanica sa PPOI-om u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0.034$), ali je ova razlika mala (Tabela br.5). Prema kategoričnoj dužini ponavaka za isključivanje 23, poređenje ESR2(CA)n genotipova (SS, LL, SL) između ispitanica sa PPOI-om i kontrolne grupe su pokazala da nema značaja ($p=0.075$), iako ispitanice sa PPOI-om imaju veću verovatnoću da će imati SS genotipove (27,6% u odnosu na 21.5%) a ispitanice sa SS i SL genotipovima (obogaćivanje S alela) su češći kod grupe ispitanica sa PPOI-om ($p=0.045$) (Tabela br.7).

Tabela br. 7. Analiza kategorične dužine ponovaka za ESR1(TA)n, ESR2(CA)n, AR(CAG)n, AR(GGN)n alela i rizika od PPOI-a

MIKROSATELITI	ISKLJUČIVANJA	GENOTIP	PPOI(n)	Kontrole(n)	OR(95%CI)	P
ESR1(TA)n	<17 vs. ≥17	SS	60(30.6%)	127(23.3%)	1.0(Ref)	
		SL	91(46.4%)	270(49.6%)	0.71(0.48-1.05)	
		LL	45(23.0%)	147(27.0%)	0.65(0.41-1.02)	
		Ukupno	196	544		0.121
		LLvs.SS+SL			0.80(0.55-1.18)	0.266
		SL+LL vs.SS			0.69(0.48-0.99)	0.045
ESR2(CA)n	<23 vs. ≥23	SS	54(27.6%)	117(21.5%)	1.0(Ref)	
		SL	94(48.0%)	252(46.3%)	0.81(0.54-1.21)	
		LL	48(24.5%)	175(32.2%)	0.59(0.38-0.94)	
		Ukupno	196	544		0.075
		LLvs.SS+SL			0.68(0.47-0.99)	0.045
		SL+LL vs.SS			0.72(0.50-1.05)	0.086
AR(CAG)n	<22 vs. ≥22	SS	39(19.9%)	124(22.8%)	1.0(Ref)	
		SL	99(50.5%)	288(52.9%)	1.09(0.71-1.67)	
		LL	58(29.6%)	132(24.3%)	1.40(0.87-2.24)	
		Ukupno	196	544		0.316
		LLvs.SS+SL			1.31(0.91-1.89)	0.144
		SL+LL vs.SS			1.19(0.79-1.78)	0.402
AR(GGN)n	<23 vs. i ≥23	SS	3(1.5%)	5(0.9%)	1.0(Ref)	
		SL	29(14.8%)	90(16.5%)	0.54(0.12-2.39)	
		LL	164(83.7%)	449(82.5%)	0.61(0.14-2.58)	
		Ukupno	196	544		0.672
		LLvs.SS+SL			1.08(0.70-1.68)	0.718
		SL+LL vs.SS			0.60(0.14-2.52)	0.483

ESR1 – estrogenski receptor alfa; ESR2 – estrogenski receptor beta; AR- androgenski receptor; PPOI-primarna prevremena ovarijalna insuficijencija, OR-(odds ratio-odnos šansi) pojedinačan odnos, CI-sigurnosni interval.

4.1.4. Dužina ponovaka CAG u AR

CAG ponavci u AR su se kretala od 12 do 31 sa srednjom dužinom od 22 kod ispitanica sa PPOI-om i od 8 do 35 sa srednjom dužinom od 22 kod kontrolne grupe. Razlika distribucije ponavaka CAG nije bila značajna između ispitanica sa PPOI-om i kontrolne grupe ($p=0.071$). GGN ponavci u AR su se kretala od 7 do 29 sa srednjom dužinom od 23 u obe grupe, kod ispitanica sa PPOI-om i kontrolne grupe nije bilo statistički značajne razlike ($p=0.620$).

4.1.5. Ograničenja i razlozi za oprez: Studija velikih razmera opravdano potvrđuje naša otkrića, iako je uzrok u ovom istraživanju veći nego u bilo kojoj predhodno objavljenoj studiji. Ovi rezultati treba da se potvrde u studijama sa PPOI-om zasnovanim na porodicama.

4.1.6. Šire implikacije nalaza: mikrosatelitni polimorfizam gena za receptore gonadnih steroida, može da doprinese genetskoj osnovi PPOI-a kod srpskih žena.

4.2. Ispitivanja povezanosti između polimorfizama gena za ESR1 i PPOI

Ispitali smo ESR1 Pvu II i Xba I polimorfizam kod 197 idiopatskih PPOI pacijenata i 547 starosno uparenih, zdravih žena kao plodnih kontrola. Prosečna starost kontrola bila je 33.6 ± 11.1 (SD) godina, a srednja vrednost za godine starosti prilikom ulaska u PPOI bila je 34.2 ± 8.6 godina. Nije nađena značajna razlika u distribuciji ESR1 Pvu II i Xba I polimorfizma između PPOI pacijenata i kontrolne grupe (Tabela br. 8 i 9.).

Tabela br. 8. Distribucija ESR1 genskog Pvu II polimorfizma kod pacijenata sa PPOI i kontrolne grupe

	N	Pvu genotipovi		
		TT(%)	TC(%)	CC(%)
PPOI	197	58(29.4)	99(50.3)	40(20.3)
Kontrola	547	146(26.7)	267(48.8)	134(24.5)

	N	Frekvencija alela	
		T(%)	C(%)
PPOI	197	215(54.6)	179(45.5)
Kontrola	547	559(51.1)	535(48.9)

Tabela br. 9. Distribucija ESR1 genskog Xba I polimorfizma kod pacijenata sa PPOI i kontrolne grupe

	N	Xba I genotipovi		
		AA(%)	AG(%)	GG(%)
PPOI	197	81(41.1)	92(46.7)	24(12.2)
Kontrola	547	210(38.4)	255(46.6)	82(15.0)

	N	Frekvencija alela	
		A(%)	G(%)
PPOI	197	254(64.5)	140(35.5)
Kontrola	547	675(61.7)	419(38.3)

ESR1 Pvu II T alel se češće pojavljivao kod PPOI pacijenata (odnos šanse-odds ratio-OR 1.15, 95% interval poverenja-confidence interval-CI 0.91-1.45, p=0.24). Istraživali smo i ESR1 Pvu II/Xba I haplotipove. TG (pX) haplotip je izuzetno redak u većini populacije koju smo ispitivali (101) i potpuno je odsutan u kohorti pojedinca u ovoj studiji. Bilo je samo šest genotipova zabeleženih u ovoj studiji, ali nije pronađena statistički značajna razlika između dve grupe koje su ispitivane (Tabela br. 10).

Tabela br. 10. Distribucija halotipova ESR1 genskog Pvu II i Xba I polimorfizma kod pacijenata sa PPOI i kontrolne grupe

Halotipovi	PPOI(%)	Kontrola (%)
CG/TA	76(38.6)	213(38.9)
CG/CA	16(8.1)	42(7.7)
CG/CG	24(12.2)	82(15.0)
CA/TA	23(11.7)	54(9.9)
CA/CA	0(0)	9(1.6)
TA/TA	58(29.4)	147(26.9)

4.3. Ispitivanja da li su varijante koje se nalaze u velikoj Han kineskoj kohorti-8q22.3 SNPs rs3847153 i rs 3108910 i po jedan SNP u HK3 (rs2278493), ESR1 (rs2234693) i BRSK 1 (rs12611091) povezane sa PPOI u srpskoj kohorti

Kod svih srpskih pacijentkinja konstatovane su sekundarne amenoreje. Prosečna starost bila je 30 godina (raspon 16-39). U 57 od 197 slučajeva (28.9%) postojala je pozitivna porodična anamneza sa PPOI u prvom ili drugom kolenu srodstva (Tabela br. 11). Kod ovih 57 porodica nije bilo srodnika prvog stepena sa neobjašnjivom mentalnom retardacijom ili sindromom ataksije-tremora. Ultrasonografski pregled je normalan u svim slučajevima, a na osnovu primenjenih kriterijuma.

Tabela br. 11. Porodična zastupljenost PPOI

Zastupljenost u porodici	28.9%
Majke sa PPOI	17.3%
Tetke sa PPOI	5.6%
Bake sa PPOI	6.1%

Tabela br. 12. Kliničke karakteristike žena sa PPOI

Menarha	13.2±2.3
Starost pri nastanku menstrualne disfunkcije	28.4±10.7
Godine starosti pri nastanku PPOI	30.2±9.6

U kontrolnoj grupi prosečna starost pacijentkinja bila je 33.6±5.2 godina, a prosečna starost za menarhu 14.2±2.2 godina.

Svi Hardy-Weinberg ekvilibrijum testovi su bili sa rezultatom $p>0.05$, što ukazuje da nema odstupanja u PPOI grupi i kontrolnoj grupi u odnosu na genotip SNP. Nedostajala je dovoljna snaga da se proceni rs3847153, čija je retka alela bila previse

retka (MAF= 0.04). Frekvencije alela su prikazane u Tabeli br.13, i ne pokazuju značajnu razliku između slučajeva i kontrola.

Tabela br. 13. Izabrani lokusi za analizu asocijacije kod 197 PPOI žena i 552 kontrola

Lokus gena	Hromozom	SNP	A1/A2	F_A	F_U	P	OR(95%CI)
8q22.3	8	Rs3847153	C/T	0.043	0.046	0.803	1.07(0.53-1.63)
8q22.3	8	Rs3108910	G/A	0.261	0.237	0.339	1.14(0.87-1.48)
ESR1	6	Rs2234693	C/T	0.461	0.493	0.296	0.88(0.7-1.11)
HK3	5	Rs2278493	A/G	0.312	0.305	0.798	0.97(0.81-1.33)
BRSK1	19	Rs12611091	C/T	0.543	0.529	0.629	0.94(0.84-1.33)

SNP:dbSNP identifikator; A1 i A2: allele 1 i 2 i njihovi nukleotidi (c- cytosine; T- thymine; A-adenine; G- guanine); F_A I F_U ukazuju na frekvencu alela kod slučajeva i kontrola; p-Fišerov ekzaktni dvorepi test, gde je $p < 0.05$ smatrano statistički značajno; OR-odnos šansi.

Za razliku od Han kineskinja, nije pronađena veza između PPOI kod srpskih žena i svakog od četiri testirana lokusa: 8q22.3, HK3, ESR1 i BRSK 1.

4.4. Ispitivanja novih varijanti u SOHLH2 genima kod žena iz Kine i Srbije sa PPOI

Kliničke karakteristike žena iz Kine i Srbije sa PPOI su prikazane u Tabeli broj 5, dok su sve nove identifikovane varijante kod žena iz Kine i Srbije sa PPOI bile različite (Tabala br. 14.).

Jedanaes novih heterozigotnih varijanti je indentifikovano u našim gupama žena sa PPOI, ali su odsutni u kontrolnim, što je pokazalo učestalost varijante SOHLH2 gena od 2% (8/364) kod kineskih i 3.6% (7/179) kod srpskih žena, respektivno.

U kohorti od 364 kineskih žena sa PPOI, pronađeno je osam novih varijanti zajedno sa još šest predhodno identifikovanih sa jedno-nukleotidnim polimorfizmom (SNP) u SOHLH2 genu.Od tih osam novih varijanti, sedam je identifikovano kod osam nepovezanih pacijenata, ali ne kod kontrolnih. Sve varijante su heterozigotne. One koje su specifične za pacijente sa PPOI su svrstane u tri nesinonimne varijante: p.Glu79Lys, p.Glu 105Gly, Thr321Pro. Za genetske varijante, poravnanje proteina otkrilo je da su u

p.Glu79Lys i p.Glu 105Gly uključene aminokiseline visokokonzervirane među sisarima.

4.4.1. Funkcionalni efekti varijanti SOHLH2 gena specifične za žene iz Kine i Srbije sa PPOI

In-silico analiza je sprovedena kako bi se predvideli funkcionalni efekti ovih varijanti, što je prikazano u Tabeli broj 14.

Tabela br. 14. Funkcionalni efekti varijanti SOHLH2 gena specifične za žene iz Kine i Srbije sa PPOI

Varijante	PolyPhen2*	SIFT**
p.Glu79Lys	Hum Div: moguće štetan (0.572) Hum Var:benigni (0.058)	štetan (0)
p.Glu 105Gly	Hum Div: moguće štetan (0.999) Hum Var: moguće štetan (0.960)	štetan (0.02)
p.Leu120Phe	Hum Div: benigni (0.246) Hum Var: benigni (0.088)	tolerišući (0.26)
p.Leu204Phe	Hum Div: benigni (0.010) Hum Var: benigni (0.015)	tolerišući (0.33)
pThr321Pro	Hum Div: benigni (0.003) Hum Var: benigni (0.012)	štetan (0.05)

*PolyPhen-2 v 2.2.2r398 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

Analize su sprovedene korišćenjem dva modela tretiranih sa različitim skupovima podataka: HumDiv model se može primeniti na evaluaciju retkih alela na lokusima potencijalno uključenih u složenim fenotipovima, gusto mapiranje regiona identifikovanih genoma na nivou studija širokih asocijacija (Wide Studies Association), a analize prirodne selekcije iz podataka sekvenci, gde se čak i blago štetne alele moraju tretirati kao štetne. Hum Var model je pogodan kod Mendelski naslednih bolesti koje zahtevaju da se varijante koje izazivaju bolesti sa drastičnim efektima razlikuju od svih drugih ljudskih varijacija, uključujući i obilne blago štetne alele. Rezultati su u rasponu od 0 do 1. Sa visokim ocenama se smatraju štetnim varijantama.

**SIFT osnovna verzija (<http://sift.jcvi.org/>)

Analize su sprovedene korišćenjem modela SIFT humanog proteina. SIFT rezultati su u rasponu od 0 do 1. Supstitucije aminokiselina su smatrane za štetne ako su rezultati ≤ 0.05 , a tolerišuće ako je rezultat > 0.05 .

Alat za nalizu exonic prigušivača i pojačivača spajanja potvrdio je da je c.314A>G DNK varijante koja je stvorila p.Glu105Gly varijantu aminokiseline i dovela do promena mesta pojačivača i prigušivača, što možda ima uticaj na RNK spajanje. Varijanta p.Thr321Proni jednom metodom nije ocenjena kao štetna.

Sinonimne exonic varijante c.951T>C i intronic varijante c.48+53C>T i c.1000+11_1000+13del smatra se da nemaju uticaja na RNK spajanje na bilo koji način. Varijanta c.-210G>T nalazi se u CpG dinukleotidu uzvodno od početka transkripcije, u regionu koji je predviđen da se nalazi unutar jezgra promotera. Taj region ima veliki broj mesta vezivanja transkripcionog faktora i CpG ostrvaca (102, 103). U našem istraživanju pronađeno je da varijanta leži 5' od ovih CpG lokacija čiji je status metilacije utvrđen.

Osmo nova varijanta c.-129C>T, bila je locirana u 5' bočne sekvence sa veoma niskom minornom frekvencijom alela (MAF) i takođe je pronađena u kontrolnoj grupi. Distribucija genotipova i frekvencija alela nisu se značajno razlikovale između PPOI slučajeva i kontrola (Tabela 15). Šest poznatih SNP uključile su u 5' bočnoj sekvenci jednu intronic dve sinonimne i dve nesinonimne varijante (Tabela 16). Nije postojala značajna razlika u genotipovima i frekvenci alela kod pacijenata u poređenju sa kontrolom.

4.4.2. Analiza novih SNP u SOHLH2 genu prisutnih kod žena iz Kine sa PPOI i kontrola

Tabela br.15. Analiza novih SNP u SOHLH2 genu prisutnih kod žena iz Kine sa PPOI i kontrola

			Broj genotipova			Br. Alela			
varijacija	lokacija	genotip	POI/kontrola		P	alel	POI/kontrola		P
c-129C>T	5'bočna sekvenca	CC	360/362		0.686*	C	724/726		0.687*
		CT	4	2			T	4	
		TT	0	0					

*Fišerov pravi test

4.4.3. Poznati SNP u SOHLH2 identifikovani kod žena iz Kine sa PPOI i kontrola

Tabela br. 16. Poznati SNP u SOHLH2 identifikovani kod žena iz Kine sa PPOI i kontrola

Lokacija	Varijacija sekvence	dbSNP ID	Varijacija aminokis.	Genotip	Broj genotipova POI/kontrola	P	alela	Broj alela POI/kontrola	P
5'bočna sekvenc-a	c-95G>A	rs3762117		GG	268 294	0.982	G	627 686	0.975
				AG	91 98				
				AA	5 6		A	101 110	
				GG	143 149		G	450 497	
Intron 1	c.48+87G>A	rs3762116		AG	164 199	0.328			0.851
				AA	57 51		A	278 301	
				CC	361 390		C	725 788	
Exon 5	c.492C>T	rs9602419	synonymous	CT	3 8	0.170			0.172
				TT	0 0		T	3 8	
				GG	91 80		G	369 376	
Exon 10	c.1015G>A	rs2296968	p.Ala339Thr	AG	187 216	0.257			0.751
				AA	85 80		A	357 376	
				CC	311 330		C	672 725	
Exon 10	c.1125C>T	rs2296967	synonymous	CT	50 65	0.602			0.813
				TT	2 3		T	54 61	
				CC	362 398		C	726 798	
Exon 10	c.1232C>T	rs143700833	p.Thr 411 Met	CT	2 2	1.000*			1.000*
				TT	0 0		T	2 2	

*Fišerov pravi test

Ispitivana je 197 žena iz Srbije sa PPOI i pronađene su četiri nove heterozigotne varijante koje su identifikovane kod sedam pacijentica. Dve od tih četiri varijante (p.Leu120Phe i p.Leu204Phe) bile su nesinonimne. Obe varijante su imale aminokiseline koje nisu očuvane među sisarima i zamene nisu procenjene kao štetne ni jednom od in-silico metoda analize (Tabela 14). Kod sinonimne exonic varijante c.1083C>A nije nađeno da ometa RNK spajanje bilo stvaranjem mesta kriptičnog spajanja ili izmenama mesta pojačivača ili prigušivača. Varijanta c.530+6T>G leži u 5' (donator) mestu spajanja introna 5 i predviđeno je da smanji efektivnost mesta uplitanja. Poznati SNP identifikovao je šest exonic varijanti. Sve osim rs2296968, pokazale su da

ne postoji značajna razlika u distribuciji genotipova ili frekvenciji alela između PPOI slučajeva i kontrola (Tabela br. 17).

4.4.4. Poznati SNP u SOHLH2 genu identifikovani kod žena iz Srbije sa PPOI i kontrola

Tabela br. 17. Poznati SNP u SOHLH2 genu identifikovani kod žena iz Srbije sa PPOI i kontrola

Lokacija	Varijacija cekvence	dbSNP ID	Varijacija aminokis.	Genotip	Broj genotipova POI/kontrola	P	alela	Broj alela POI/kontrola	P
Exon 5	c.492C>T	rs9602419	Sininimo-us	CC	191 196	0.541*	C	388 396	0.543*
				CT	6 4				
				TT	0 0		T	6 4	
				GG	195 199		G	392 399	
Exon 7	c.691G>A	rs150925868	p.Val123 Ile	AG	2 1	0.621*			0.622*
				AA	0 0		A	2 1	
				GG	192 194		G	389 394	
Exon 7	c.778G>A	rs34933583	p.Val260 Ile	AG	5 6	0.779			0.781
				AA	0 0		A	5 6	
				GG	141 120		G	336 309	
Exon 10	c.1015G>A	rs2296968	p.Ala339Thr	AG	54 69	0.008 ^a			0.004 ^a
				AA	2 11		A	58 91	
				CC	145 161		C	340 357	
Exon 10	c.1125C>T	rs2296967	Sinonimo-us	CT	50 35	0.114*			0.204
				TT	2 4		T	54 43	
				GG	193 192		G	390 392	
Exon 10	c.1232C>T	rs61750906	p.Thr411 Met	AG	4 8	0.252			0.255
				AA	0 0		A	4 8	

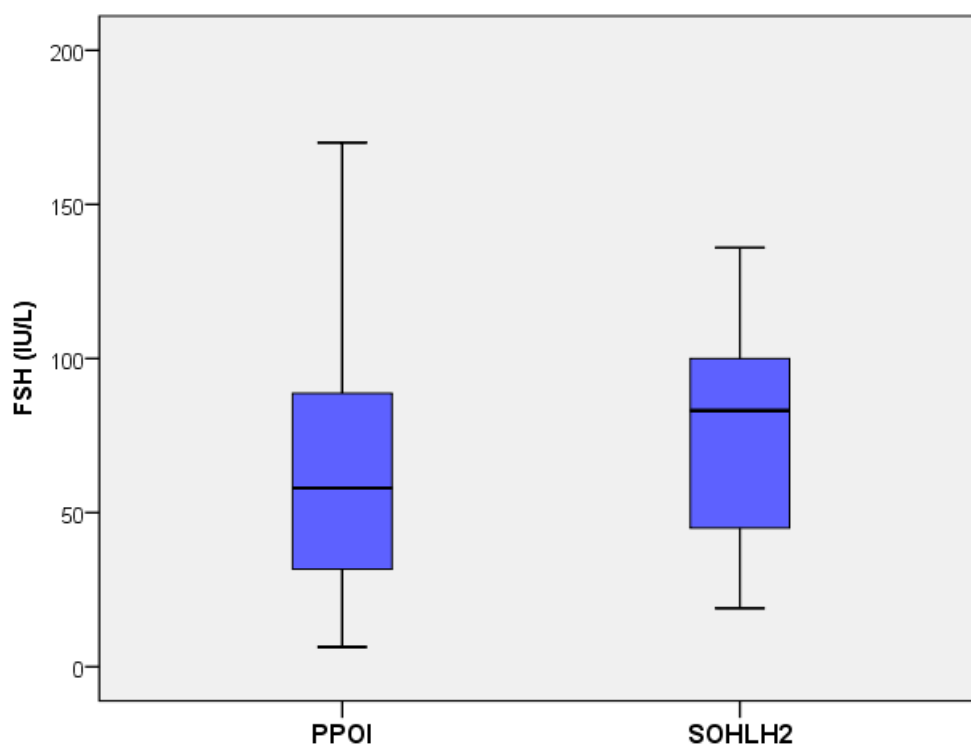
*Fišerov pravi test

^a statistički značajno

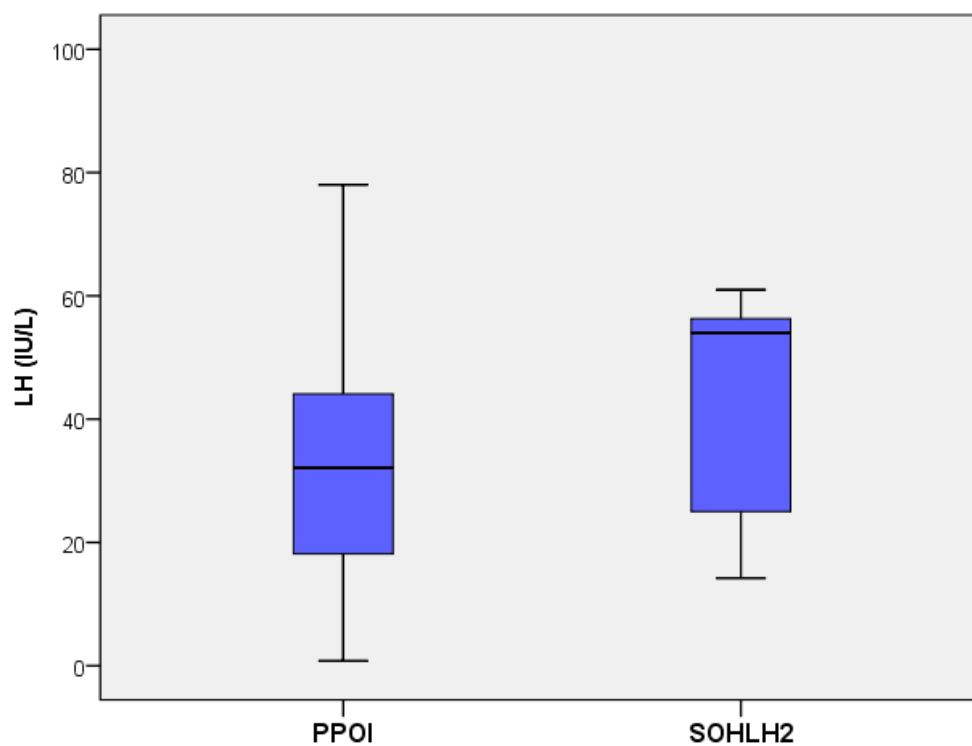
4.5. Ispitivanja karakteristika žena iz Srbije sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2

4.5.1 Poređenje vrednosti hormona FSH, LH, prolaktina, estradiola i progesterona

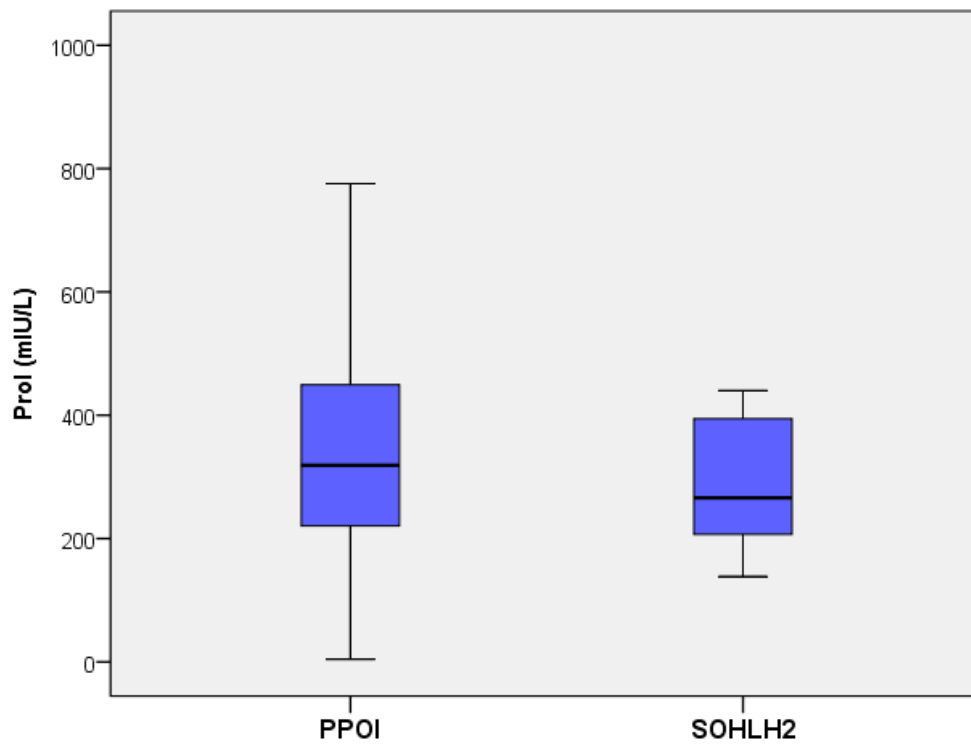
Grafikon br. 5. Vrednosti FSH hormona u grupi žena iz Srbije sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2



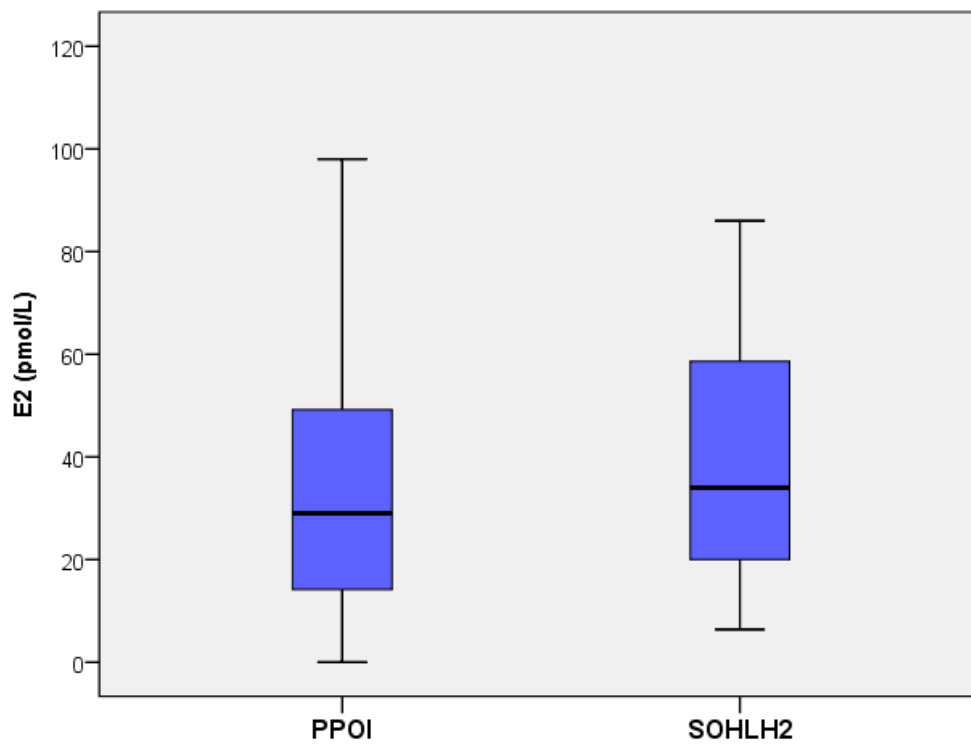
Grafikon br. 6. Vrednosti LH hormona u grupi žena iz Srbije sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2



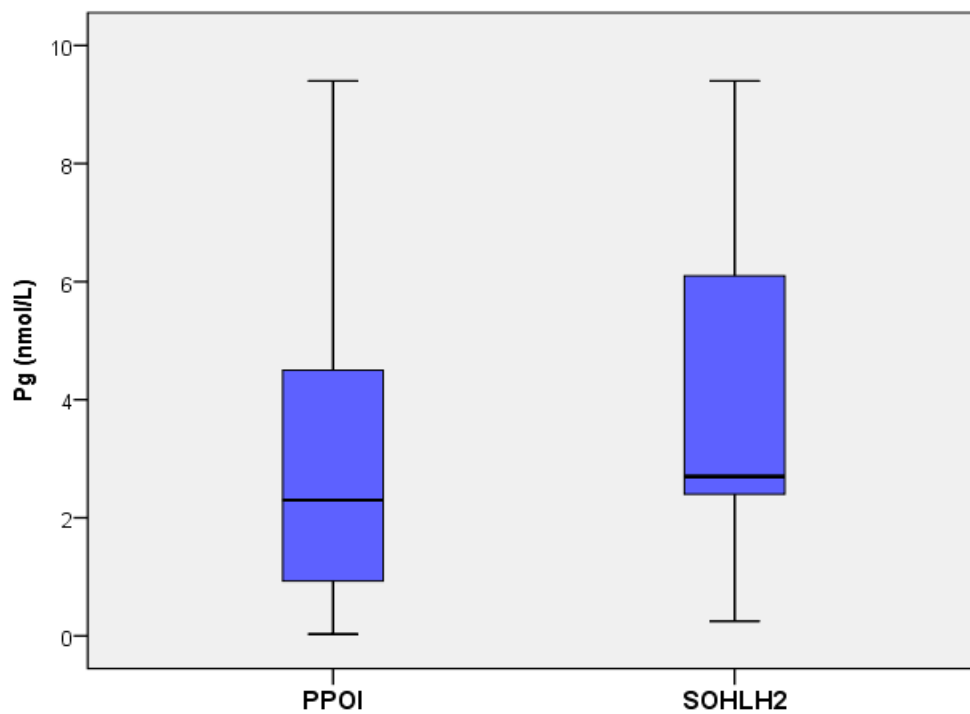
Grafikon br. 7. Vrednosti prolaktina u grupi žena iz Srbije sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2



Grafikon br. 8. Vrednosti estradiola u grupi žena iz Srbije sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2



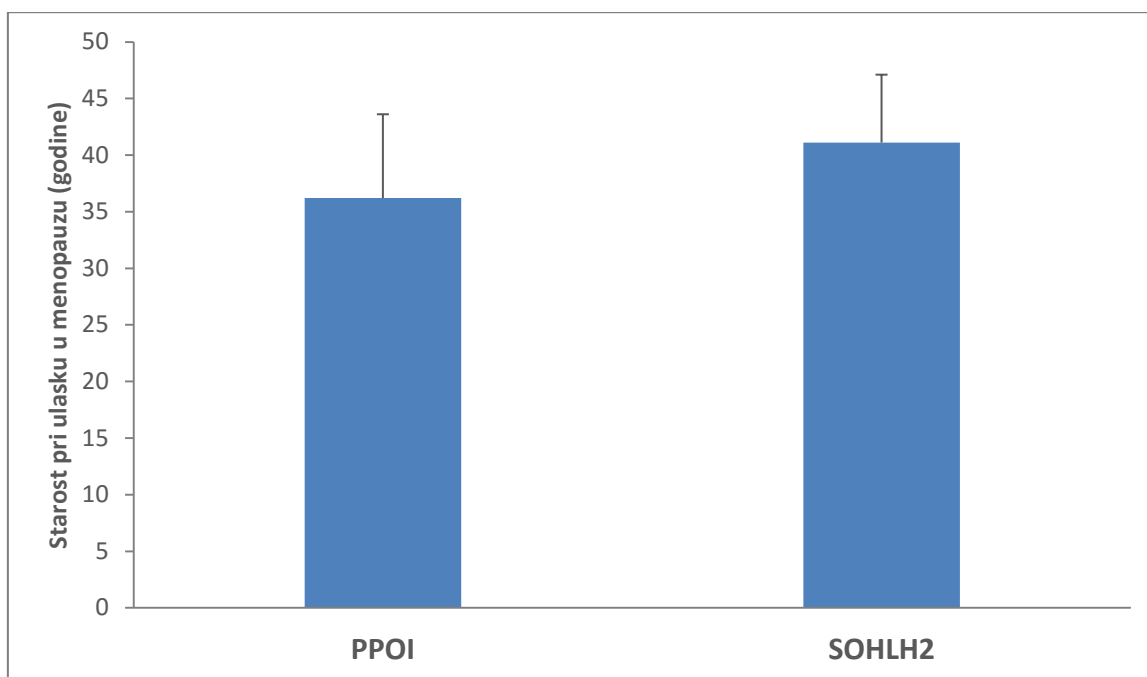
Grafikon br. 9. Vrednosti progesterona u grupi žena iz Srbije sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2



Dobijeni rezultati ukazuju da nema statistički značajne razlike između grupa u hormonskom statusu za FSH, LH, E₂, prolaktin i progesteron ($p < 0.05$).

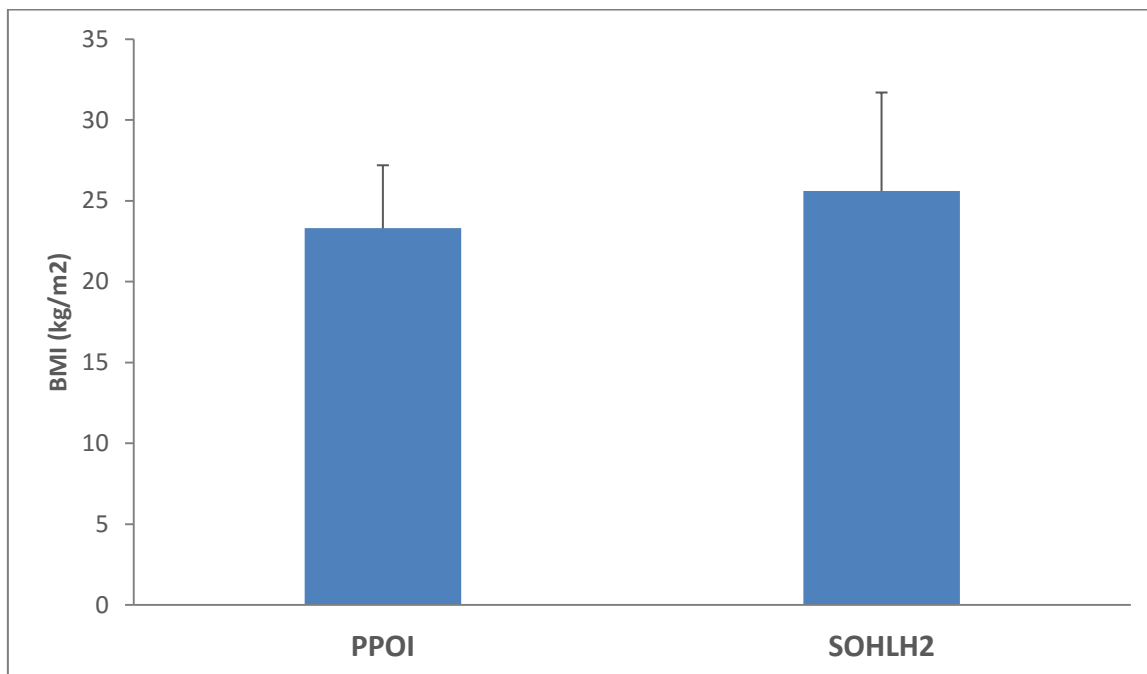
4.5.2. Pređenje godina starosti pri ulasku u menopauzu i BMI kod žena sa PPOI i žena sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2

Grafikon br.10. Godine starosti pri ulasku u menopauzu kod žena sa PPOI i žena sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2



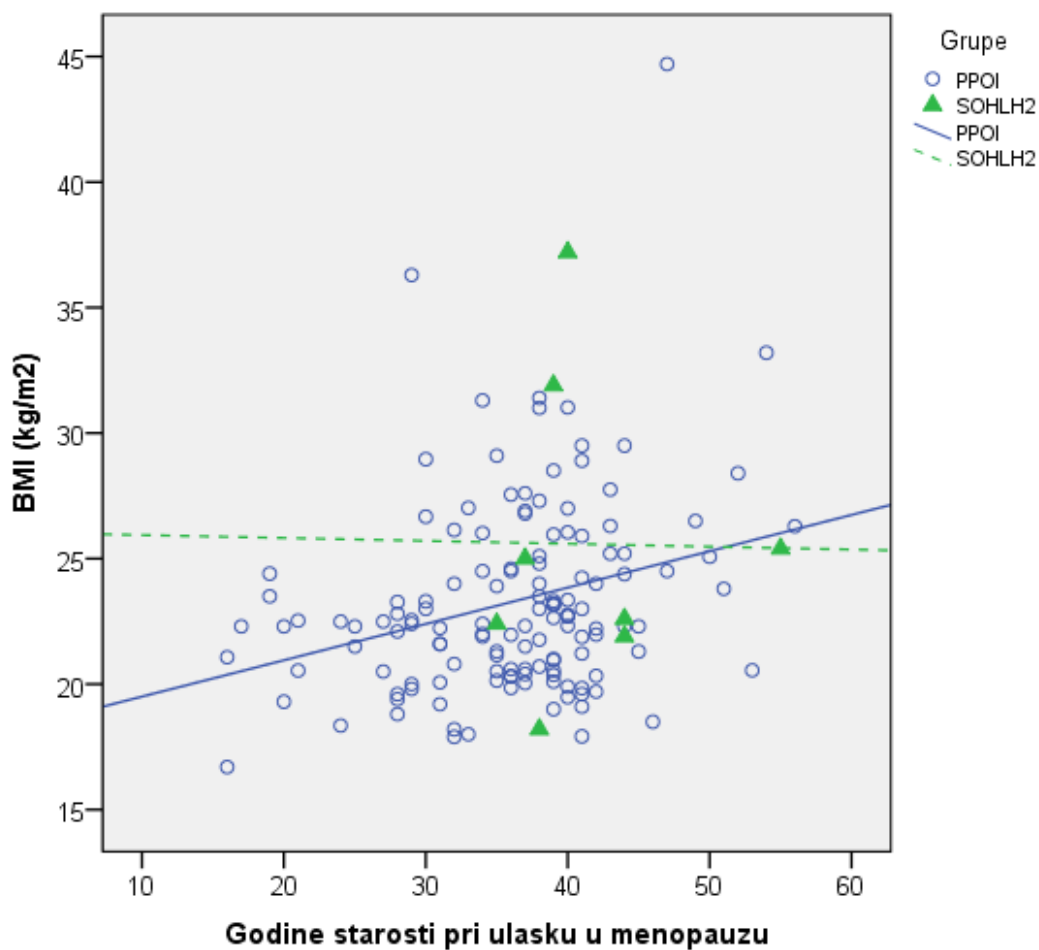
Prosečna starost pri ulasku u menopauzu kod žena sa PPOI iznosi 36.2 ± 7.4 godina, dok je kod žena sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2 41.1 ± 6.0 , što nije statistički značajna razlika ($t=1.963$; $p=0.051$).

Grafikon br. 11. Odnos BMI(kg/m²) kod žena sa PPOI i žena PPOI i nekom od varijanti SOHLH2



Prosečna vrednost BMI kod žena sa PPOI iznosi 23.3 ± 3.9 , dok je kod žena sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2 25.6 ± 6.1 , što nije statistički značajna razlika ($t=1.565$; $p=0.120$).

Grafikon br. 12. Odnos godina starosti pri ulasku u menopauzu i BMI unutar svake grupe



Postoji statistički značajna slaba pozitivna povezanost godina starosti pri ulasku u menopauzu i vrednosti BMI kod grupe sa PPOI ($r=0.284$; $p=0.001$).

Ne postoji statistički značajna povezanost godina starosti pri ulasku u menopauzu i vrednosti BMI kod grupe sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2 ($r=0.012$; $p= 0.978$).

4.6. Ispitivanja za kolagen Tipa I Alfa1 genskog polimorfizma kod žena iz Srbije sa PPOI

Ispitanice su podeljene u tri grupe, prema COLIA1 genom polimorfizmu, odnosno SS, Ss i ss. Samo je jedna ispitanica imala „ss“ genotip. Polazne karakteristike grupe prikazane su u Tabeli broj 18. Nije pronađena značajna razlika između grupa za: starost, menarhu, period amenoreje, paritet, starost majke pri ulasku u menopauzu, dijetetski unos kalcijuma (osim za ženu u Ss grupi koja je imala nedovoljni unos kalcijuma), navika pušenja (45% su pušači), BMI, odnos obima struk/kuk (W&H) i Z-skor (Tabela broj 18.).

Hormonski parametri su okarakterisani povišenim FSH (68.3 ± 8.4 IU/L) i LH (38 ± 5.6 IU/L) i niskim nivoom estradiola (38.2 ± 10.7 pmol/L), progesterona (2.1 ± 0.9 nM/L) i testosterona (1.2 ± 0.6 nM/L). Prolaktin je bio u normalnom opsegu (310.6 ± 68.2 nmol/L).

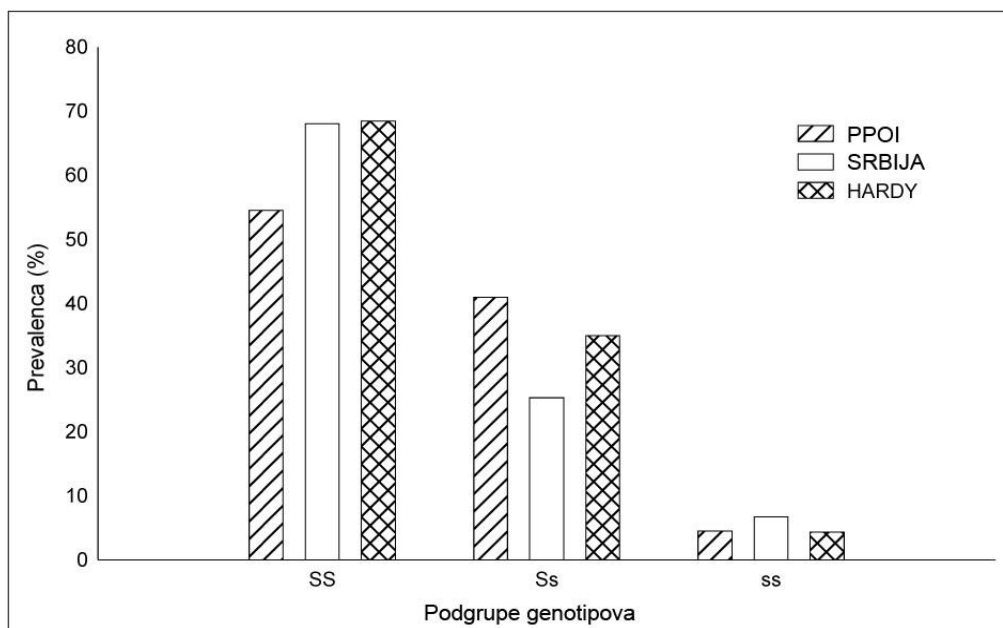
Tabela br. 18. Polazne karakteristike grupe sa standardnom devijacijom (SD)

GENOTIP	SS grupa	Ss grupa
GODINE STAROSTI	40 ± 4.9	41.7 ± 3.5
MENARHA	14.7 ± 2.1	12.6 ± 1.2
PERIOD AMENOREJE	6.7 ± 6.2	6.9 ± 6.6
BROJ POROĐAJA	1.0 ± 0.7	1.8 ± 1.6
STAROST MAJKE PRI ULASKU U MENOPAUZU	48.6 ± 5.9	48.3 ± 5.8
BMI (kg/m ²)	24.4 ± 3.0	26.1 ± 5.4
ODNOS OBIMA STRUK/KUK	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Z SKOR L2-L4 BMD(g/cm ²)	-0.9 ± 1.5	0.4 ± 1.6

Genotipna učestalost kod ispitanica sa PPOI-om je bila SS-54.5%. Ss-41.0% a ss-4.5%, dok je frekvencija genotipa u Hardy-Weinberg ravnoteži bila SS-68.4%, Ss-

35.9% i ss-4.4% (Grafikon br.13). Ovo ukazuje na beznačajan višak heterozigota kod ispitanica sa PPOI-om.

Grafikon br. 13. Prevalenca podgrupe genotipova



PPOI- primarna prevremena ovarijalna insuficijencija

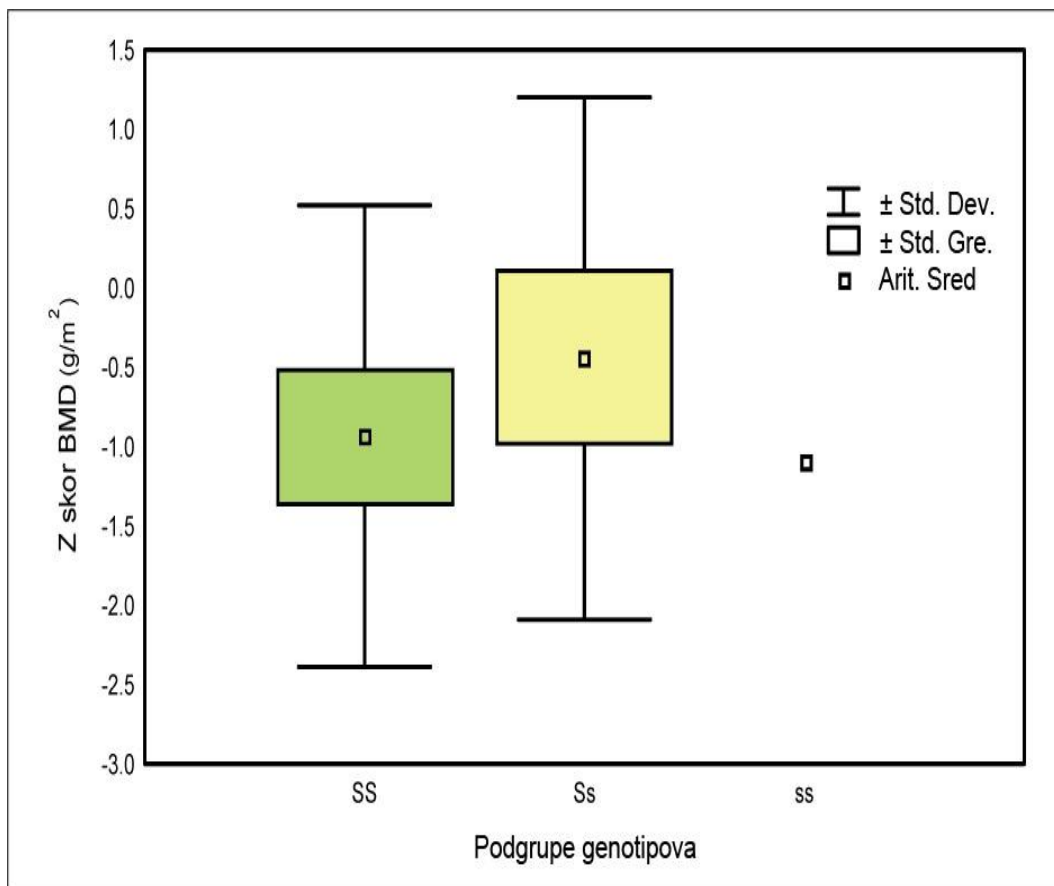
SRBIJA- zdrave menopauzne žene iz Srbije

HARDY- Hardy-Weinberg equilibrium

Kod 120 srpskih žena koje su normalno ušle u menopauzu, genotipna učestalost je bila SS-66.6% homozigoti i Ss-24.1% heterozigoti (104).

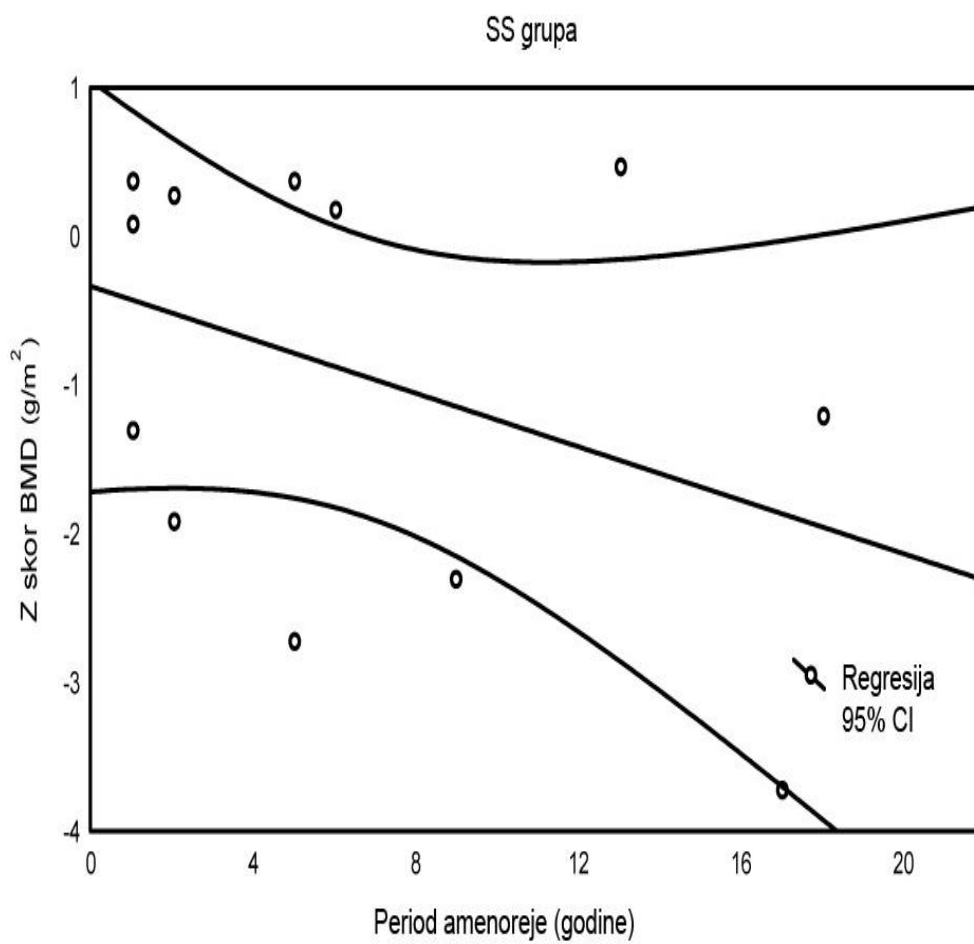
Nema uočenih razlika između grupa u odnosu na BMD lumbalne kičme (Grafikon br. 14).

Grafikon br. 14. Z skor podgrupe genotipova

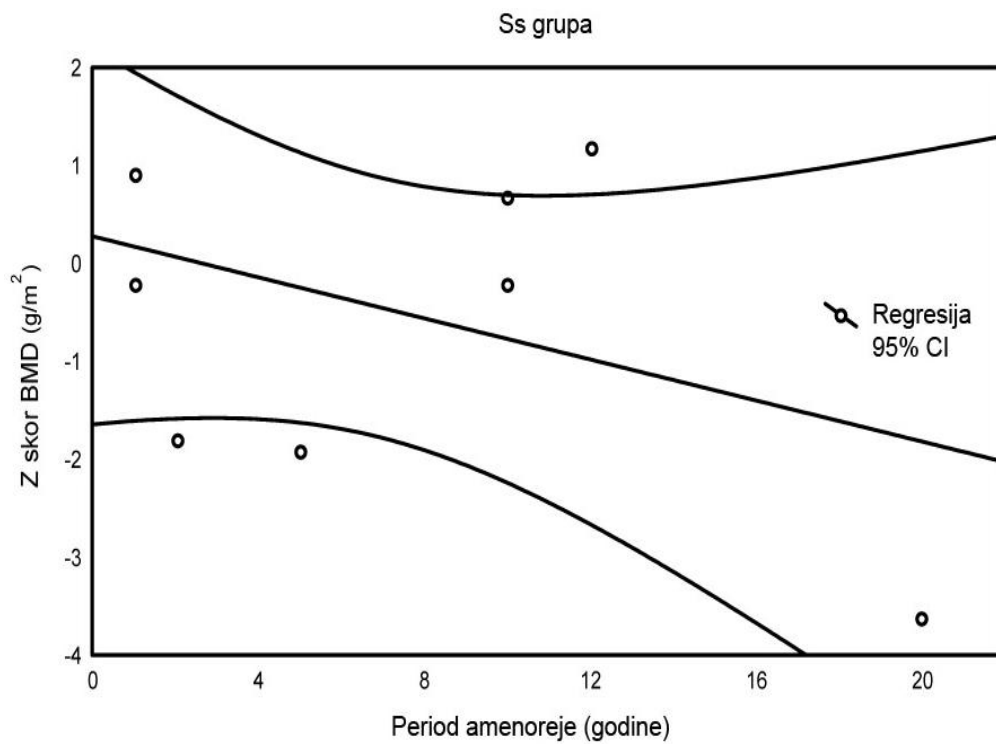


Ss grupa je imala 4%viši Z-skor od SS grupe (-0.44 u odnosu na -0.93). Dok je SS grupa pokazala negativnu korelaciju između BMI i Z-skora ($R=-0.16$), u Ss grupi je prisutna pozitivna korelacija ($R=0.06$), ali su obe korelacije bez značaja. Kod žena sa prekomernom težinom ($BMI>25.0\text{kg/m}^2$) utvrđena je pozitivna korelacija između BMI i pariteta ($R=0.61$, $p<0.05$) što ukazuje da su žene sa više od dvoje dece bile više gojazne. Slabo značajna negativna korelacija utvrđena je između perioda amenoreje (u godinama) i Z-skora (<5 godina amenoreje $R=-0.4$, >5 godina amenoreje $R= 0.34$), (Grafikon 15 i 16). Takođe je utvrđena i slabo značajna negativna korelacija između starosti i Z-skora ($R=-0.17$) i menarhe i Z-skora ($R=-0,37$).

Grafikon br. 15. Korelacija između BMD-Z skora i perioda amenoreje (godine) u SS grupi



Grafikon br. 16. Korelacija između BMD-Z skora i perioda amenoreje (godine) u Ss grupi



5. DISKUSIJA

Rezultati ispitivanja polimorfizma mikrosatelitnih ponovaka u genima za gonadne steroide kod žena iz Srbije sa PPOI-om pokazuju da polimorfizmi mikrosatelitnih ponovaka u genima za ESR1(TA)n i ESR2(CA)n mogu imati potencijalnu ulogu u genetskom mehanizmu etiologije PPOI-a. Nije nađena statistički značajna razlika u pojavi AR(CAG)n i AR(GGN)n kod žena iz Srbije sa PPOI-om.

Gennari i saradnici (43) su pokazali da se broj ESR1(TA)n ponavaka razlikuje prema etičkoj pripadnosti, sa procenjenim glavnim pikovima na 14 ponavaka kod evropskih populacija i 15 ponavaka kod azijskih populacija. U našoj studiji glavni pik ESR1(TA)n je na 15 ponavaka za srpsku populaciju. Utvrdili smo da srpske pacijentkinje sa PPOI-om imaju nešto kraće dužine ponovaka od kontrolne, ali „p“ vrednost je bila na granici značaja. Ovo nije u skladu sa studijom sprovedenom kod korejske populacije kojom se sugerše da ESR1(TA)n ne doprinosi razvoju PPOI-a (105). Osim toga su našli da su kratki aleli u ESR1(TA)n bili značajno ređi kod PPOI u poređenju sa azijskim ženama(45). Mi smo utvrdili da je SS genotip kod pacijenata sa PPOI-om češći nego u kontrolnoj grupi (30.6% : 23.3%).

Našli smo da je za ESR2(CA)n više pacijenata sa PPOI-om imalo kraće dužine ponavaka. Razlika je bila statistički značajna. Logističkom regresionom analizom nije se potvrdilo da je i jedan od genotipova (SS, SL i LL) ESR2(CA)n povezan sa PPOI-om koristeći se kategoričkom vrednošću za izostavljanje od 23 (p=0.075). Statistički značaj je dobijen (p= 0.045) kada se uporede LL sa SS+SL (Tabela br.7). To znači da bi žene koje nose S alel imale veću šansu za razvoj PPOI-a.

ESR2(CA)n prvi put je okarakterisan kao vrlo polimorfan (CA) dinukleotid ponavaka kod japanskog stanovništva 1998. godine (106). Od tada, Bretherick i saradnici (45) su jedini objavili jednu studiju koja nije mogla da dokaže vezu između ESR2(CA)n i PPOI. Prema našem saznanjima ovo je prva studija koja pokazuje da je ESR2(CA)n ponovljeni polimorfizam koji je statistički značajno povezan sa PPOI-om. Ispitanice sa PPOI-om imaju takođe tendenciju da u ESR1 imaju kraće TA ponavljanje dužine, tako da se S aleli u ESR1 i ESR2 mogu smatrati kao faktori rizika za PPOI kod srpskih žena.

Klasifikacijom ponavljanja SS, SL i LL genotipova pokazano je da većina ispitivanih slučajeva i kontrola ima SL genotip češće nego SS i LL genotip za ESR1(TA)_n, ESR2(CA)_n i AR(CAG)_n. Međutim, za AR (GGN) ponavljanja, LL genotip je najčešći. Kako bi se stekao uvid u klinički značaj, Cls u kategoričnoj analizi varijable genotipa ova četiri mikrosatelita (Tabela br.7) može da bude informativan. Većina Cls su prilično široka, tako da se tačna razlika između ispitanica sa PPOI i kontrolnih ne mogu odbaciti. Mnogo veća kontrolna grupa bi bila potrebna da se naši nalazi potvrde.

Analizirali smo kodiranje regiona tandemskih ponavaka AR gena: 8-35CAG ponavaka (kodiranje poliglutaminom, poly Q) i 7-27 GGN ponavaka (kodiranje poliglicinom, poly G). Zajedno, ovi polimorfizmi javljaju se približno kod 90% žena koje imaju heterozigotne alele gena za AR. Trakt poliglutamina i poliglicina ograničava aktivaciju funkcije-1 (AF1) domen AR proteina i oba su prijavljena da su modulatori faktora aktivnosti AR transkripcija (107). Tsezou i saradnici (108) su našli da CAG poliglutamin pružanje, u amino-terminalnom domenu gena za AR, obrnuto utiče na funkciju receptora, kao faktora transkripcije, a pretpostavlja se da učestvuje u interakcijama između AR proteina i različitih koaktivatora, sa dugim ponavcima kao inhibitorima ovih interakcija, čime se objašnjava niža aktivnost receptora. Naša analiza sa kontinuiranim promenljivim je pokazala da varijante u genu za AR(CAG)_n i AR(GGN)_n nisu pokazale povezanost sa PPOI-om u našoj kohorti ispitanica. Između četiri ispitivana mikrosatelita u literaturi je AR(CAG)_n najčešće testiran kod PPOI-a (45,48-50). Različiti izveštaji u vezi dužine alela mogu se objasniti genetičkim razlikama u etički različitim populacijama, a možda i zbog različitih veličina uzoraka. Na osnovu naših rezultata, možemo sa oprezom izvući kontraverzan zaključak da varijante u genu za AR(CAG)_n i (GGN)_n nemaju ključnu ulogu u disfunkciji folikula kod PPOI-a.

U ispitivanja povezanosti polimorfizama gena za ESR1 sa PPOI kod žena iz Srbije nismo pronašli bilo kakvu povezanost ESR1 PvuII i Xba I sa introničnim SNP polimorfizmom kod PPOI pacijentkinja srpskog porekla. Evidentno je da je T alel Pvu II SNP češći kod PPOI kohorte pacijenata nego u kontrolnoj grupi, što formalno ne isključuje činjenicu da T alel ima uticaj na PPOI. Povećanje veličine kohorte pacijenata

i kontrola garantuje obezbeđivanje dovoljne statističke moći da bi se otkrile razlike dve grupe, iako je naša studija najveća objavljena do sada.

Cordts i saradnici (109) ispitivali su 70 PPOI pacijentkinja i 73 zdrave žene u menopauzi, brazilskog porekla. Našli su povezanost Pvu II polimorfizma sa PPOI ali ne i povezanost Xba I polimorfizma sa PPOI. Bretherick i saradnici (110) ispitivali su 55 PPOI pacijentkinja i 107 kontrolnih, bile su belkinje azijskog porekla. Našao je manju frekvencu TT genotipa u Pvu II i AA genotipa u Xba I kod PPOI u odnosu na kontrole ($p < 0.0001$). Liu i saradnici (111) ispitivali su 155 idiopatskih PPOI pacijentkinja i 150 zdravih kontrola, kineskog porekla. Frekvencija P alela Pvu II je značajno veća kod pacijentkinja sa PPOI nego u kontrolnoj grupi ($p = 0.008$) i frekvencija X(G) alela Xba I je takođe bila veća kod pacijentkinja sa PPOI ($p = 0.013$). Nosioци CC(PP) genotipa su imali veći rizik od PPOI nego oni sa TT(pp) genotipovima ($p = 0.011$). Haplotip CG(PX) bio je povezan sa značajno povećanim rizikom od idiopatske PPOI. Yoon i saradnici (105) ispitivali su 125 PPOI pacijentkinja i 221 kontrolnih žena koje su bile u menopauzi. Sve ispitanice su bile Korejskog porekla. Studija je pokazala da nema povezanosti između Xba I i PPOI. Nađena je viša frekvencija TT genotipa (PvuII) kod PPOI u odnosu na kontrole ($p = 0.004$) i frekvencija TA haplotipa značajno veća kod PPOI pacijenata u odnosu na kontrole ($p = 0.002$). Nedostatak povezanosti u našoj studiji nije u korelaciji sa nalazima predhodne studije (105). Razlika nije zbog veličine uzorka koji je nešto manji u predhodnoj studiji sa korejskim ženama u odnosu na našu, ali ukazuje na to da njihovi rezultati mogu biti specifični za korejsku populaciju. Yang i saradnici (112) su ispitivali 100 PPOI pacijentkinja i 200 zdravih žena u menopauzi korejskog porekla. Nije pronađeno da je značajni efekat alela povezan sa Pvu II genotipom, ali je pronađeno da je X(G) alel Xba I varijante povezan sa smanjenim rizikom od PPOI. CA(Px) haplotip je značajno smanjio rizik za idiopatsku PPOI.

Ovi različiti rezultati ispitivanja, ali i drugi, koji se tiču distribucije ESR1 Pvu II i Xba I genotipa i haplotipa može se objasniti genetskim razlikama kod etički različitih populacija i možda različitim veličinama uzoraka. Trenutno je usaglašeno da su faktori, u studijama genomske široke asocijacije, mešoviti, odnosno potiču od životne sredine i genetike (110) i razumno je pretpostaviti da su podjednako mešoviti kada se varijante u genima kandidatima ispituju na pridruživanje. Iako je još uvek uticaj ESR1 PvuII i Xba

I polimorfizma na PPOI kontraverzan, zaključujemo da kod srpskih žena oni nisu često povezani sa PPOI i ne mogu da doprinesu, direktno ili indirektno, genetskoj osnovi PPOI.

U velikom Han kineskom uzorku, značaj za SNP je postojao za 8q22.3 ($p=10^{-6}$) ili HK3, ESR1, BRSK1 ($p\leq 0.05$). Naši rezultati mogu ukazivati na to da različiti narodi mogu pokazivati razlike u putevima genske regulacije i gena koji uzrokuju PPOI. Slične razlike su zabeležene u FSHR, BMP15, NOBOX, FOXL2, TGFBR3, CDKN1B, FOXO3A (27, 30, 58,113-127). Iz toga zaključujemo da se uzrok PPOI ne bi trebao tražiti na osnovu rezultata iz jedne etičke grupe.

Drugi faktor koji može doprineti razlici između srpske i kineske kohorte je u tome da srpska kohorta ima uzorak nedovoljne moći da se otkriju manje perturbacije. Koristili smo Genetic Power Calculator paket (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/>) za izračunavanje moći otkrivanja povezanosti između testiranih SNP i PPOI u srpskoj kohorti. Imali smo dovoljno energije za rs3847153, rs3108910 i rs12611091, ali smanjenu moć za rs 2234693 i rs2278493 pri $p=0.05$ (<80%).

Treći faktor može biti da kod Han kineskih i srpskih žena postoji vezana neravnoteža između relevantnih dijagnostičkih SNP i stvarne bolesti koja izaziva varijaciju alela. Međutim, odgovarajuće dijagnostičke SNP varijacije alela mogu biti različite za dve populacije.

Četvrti faktor može biti, da se redosled varijacija u HK3, ESR1 i BRSK1 još može naći u srpskih žena sa PPOI ako su sekvencionirani celi geni. Potencijalne varijante ne moraju uvek biti u vezi sa neravnotežom sa testiranim SNP.

Ispitivanjem novih varijanti u SOHLH2 genima kod žena iz Kine i Srbije sa PPOI po prvi put smo pokazali da je SOHLH2 gen odgovoran u etiologiji PPOI. Identifikovano je pet novih heterozigotnih nesinonimnih varijanti kod četiri kineske žene: p.Glu79Lis (2 slučaja), p.Glu105Gln i p.Thr321Pro, i kod četiri srpske žene: p.Leu120Phe (3 slučaja) i p.Leu204Phe. Poravnanja proteina otkrila su, da su „divlji“ tipovi Glu79 i Glu105 visoko konzervativni kod sisara, dok Thr321 nije. Leu na pozicijama 120 i 204 je konzervativan kod Homo sapiens-a, Pan troglodytes, Macaca mulatta, a kod miša i pacova je zamenjen sa Phe. To sugerise da pThr321Pro, p.Leu120Phe i p.Leu204Phe možda nemaju štetne efekte. Predpostavlja se

u skladu sa evolucionom konzervacijom i najboljim dokazima supstitucije da su potencijalno patogeni p.Glu79Lis i p.Glu105Gli u kineskoj kohorti pacijenata.

Promoter varijante C-210G>A identifikovan je kod kineskih žena sa PPOI ali ne i u kontrolnoj grupi. Predpostavlja se da ova varijanta može poremetiti SOHLH2 ekspresiju i funkciju gena, ometanjem uzvodnih regulatora transkripcije ili epigenetskom modifikacijom.

Promoter varijante c.530+6C>T, koja je pronadjena u srpskoj kohorti pacijenata, najverovatnije ima štetan uticaj, tako što utiče na to da se RNK izmenjeno spoji i na taj način negativno utiče na prevedeni protein.

Identifikovani novi i poznati SNP ne razlikuju se u genotipu i frekvenciji alela između slučajeva i kontrola. To sugeriše da neće biti osetljivih varijanti alela ili će biti nedovoljni da izazovu PPOI.

U germinalnim ćelijama transkripcione unakrsne regulacije pojavljuju se SOHLH1 i SOHLH2 geni kao glavni regulatori drugih faktora transkripcije (128).SOHLH2 gen, a posebno bHLH regulator transkripcije, je od suštinskog značaja za ranu folikulogenezu. Podskup ključnih faktora transkripcije i njihovih ciljeva u ovocitu SOHLH1, FIGLA, NOBOX, LHX8, Pou5fl, Kit, ZP1, ZP3 i Gdj9 bili su pogrešno izraženi u jajnicima koji su deficitarni sa SOHLH2 (129,113). Na osnovu svega ovoga predpostavljamo da nekoliko novih varijanti koje smo identifikovali mogu uticati na SOHLH2 protein tako što daje poremećaj prelaska primordijalnih u primarne folikule samim tim prevremeni gubitak jajnih ćelija , što dovodi do PPOI.

Mi smo se orjentisali na ispitivanje specifičnih gena uključenih u ranu ovogenezu i folikulogenezu. Moguće varijante FIGLA (35), NOBOX (30,113-115), LHX8 (130) su bile identifikovane u grupama pacijenata različitog etičkog porekla, što ukazuje da podskup žena sa PPOI širom sveta možda krije štetne varijante ovih gena. Specifično molekularno narušavanje u datom genu može da varira, čak i unutar date etičke grupe (molekularna heterogenost). U našoj studiji, ni jedna od pronađenih varijanti ne objašnjava više od 10% slučajeva u bilo kojoj etičkoj grupi. Iz toga se može zaključiti da PPOI karakteriše genetska heterogenost u različitim etičkim grupama.

Studije asocijacije gena kandidata, analize niz-komparativne genomske hibridizacije (niz-CGH) i široke genske studije asocijacije (GWAS) često su ograničene sa malom veličinom uzorka, čime se ograničava statistička moć da se otkrije pouzdana

veza. GWAS najveće razmere našao je osetljiv lokus na 8q22.3 koji se nalazio u regionu koji je siromašan sa genima i u kome se ne nalaze geni kandidati (96). Veza ovog regiona i PPOI ostaje prihvatljiva, dajući posebnu pažnju pojačivaču i verovanju da regulator geni mogu da postoje (96).

Naša identifikacija novih heterozigotnih varijanti u SOHLH2 genu, kod žena sa PPOI kineskog i srpskog porekla, sugeriše doprinos etiologiji PPOI. To ukazuje na ključnu ulogu faktora transkripcije SOHLH2 u ranoj ovogenezi i folikulogenezi. Potencijalno štetne varijante koje smo opisali zaslužuju dalja funkcionalna ispitivanja. Buduća istraživanja trebala bi biti usmerena na ovocit-specifične transkripcione puteve ili regulatorne mreže za duublje istraživanje genetike PPOI.

Istraživanje COLIA1 polimorfizam gena kod žena iz Srbije sa PPOI je prva studija do sada. Osnovni zadatak BMD merenja je identifikovati žene sa PPOI i povećanim rizikom za osteoporozu. Time se omogućava odgovarajući tretman. Osteoporoza je jedana od kasnih komplikacija PPOI-a.

Jezgra koštanog tkiva dobijena od žena sa Ss genotipom imala su smanjen neorganski sadržaj i povećan organski sadržaj u poređenju sa jezgrima uzetim od žena sa SS genotipom, verovatno odražavajući abnormalnosti u mineralizaciji kod Ss genotipa. Pojedine ispitanice sa ss genotipom su imale izmenjen odnos vrednosti COLIA1 i 2 koje bi mogle dovesti do smanjene mase kostiju ili povećanog rizika od trabekularne perforacije tokom godina ili promene u koštanom tkivu tokom menopauze. Čini se da glavni uzrok osteoporoze nije u samom osteoblastu već u mehanizmu koji obezbeđuje da se značajni broj osteoblasta okupi na pravom mestu u pravo vreme.

Meta analiza podataka iz šesnaest objavljenih studija, uključujući ukupno 4965 ispitanica, pokazala je značajnu vezu između prenosa u COLIA1 "s" alelu i niskom BMD (131,132).

Tip I kolagen, glavni protein kosti, je heterodimer sa dva kolagena lanca koji su kodirani genima COLIA1 i 2 (133). Jednonukleotidni G→T polimorfizam je povezan sa povećanim afinitetom vezivanja za protein Sp1 u COLIA1 genu, povećanom specifičnom transkripcijom alela u COLIA1, povećanom proizvodnjom kolagen proteina i razlikom u jačini kostiju (51). Izgleda da Ss heterozigoti imaju niži BMD i veći rizik za osteoporozu i prelome.

Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Liden i saradnika (134) koji nije pronašao značajne razlike između genotipova grupa u vezi sa BMD lumbalnog dela kičme. Njegovo istraživanje je verovatno na malom broju ispitanica sa „ss“ homozigotnim genotipom, obzirom da je procenjena učestalost PPOI kod 0.9%-3% stanovništva (135).

Razlike u BMD su praćene razlikama u telesnoj težini. Gojaznost ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$) utiče na BMD pozitivno. Hadjidakis i saradnici (136) su primetili značajnu pozitivnu korelaciju između kičmene mineralne gustine i BMI u periodu neposredno nakon poslednje menstruacije i u svim starosnim segmentima kod PPOI. U našoj studiji bila je pozitivna korelacija samo u Ss grupi ($R=0.06$). Ovo se može objasniti kao uticaj endokrine aktivnosti masnog tkiva na metabolizam kosti. Našli smo statistički značajnu korelaciju između BMI i pariteta, što ukazuje da su žene lakše ostajale u drugom stanju sa većim BMI, što takođe možemo objasniti endokrinom aktivnošću masnog tkiva.

Neki istraživači su našli da COLIA1 aleli mogu da predvide prelome, nakon korelacije sa BMD, drugi istraživači nisu pronašli vezu između COLIA1 genotipa i BMD ili preloma usled osteoporoze (134,137). Neki faktori doprinose riziku od osteoporoznih preloma uključujući i starenje, nizak BMI, predhodni prelomi, slabost mišića, oštećenje vida. U našim grupama je samo jedna žena sa Ss- genotipom imala višestruke prelome. Ona je danas stara 44 godine, menarha je bila sa 13 godina, menstruirala je 20 godina i imala regularne cikluse, BMI je bio 24.2 kg/m^2 , a odnos obima struka i kuka 0.8. Njen unos kalcijuma nije bio dovoljan jer nije volela mlečne proizvode i bila je pušač. Dodatno je imala reumatoidni artritis i Sicca sindrom.

Postoje mnoge gen-gen i gen-okolina interakcije koje utiču na kvalitet kosti. Mnoge kosti su češće pod uticajem velikog broja gena sa relativno malim efektima na kost, nego par gena sa velikim efektom, kao što su Kobayashi i saradnici primetili (138). Naši rezultati su konzistentni sa predhodnim nalazima (139) da različiti geni mogu da deluju u različitim kombinacijama, i tako utiču na individualni stepen osetljivosti kod određenih ljudi. Kod mladih žena sa PPOI COLIA1 ne može identifikovati one koje su u većoj opasnosti od osteoporoze.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata i diskusije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- PPOI se smatra multifaktorijalnom bolešću, gde je fenotip najverovatnije posledica varijacije sekvence u više od jednog gena.
- Pacijenti sa PPOI nose kraće ponovke u ESR1(TA)_n i ESR2(CA)_n i S aleli u ovim genima mogu se smatrati kao faktori rizika za PPOI kod žena iz Srbije.
- Dva ESR1 SNP, Pvu II i Xba, nisu uobičajno povezani sa PPOI kod žena iz Srbije i ne mogu da doprinesu genetskoj osnovi PPOI.
- Naša identifikacija novih varijanti SOHLH2 gena kod žena iz Kine i Srbije sa PPOI, snažno ukazuju na važnu ulogu SOHLH2 gena u etiologiji PPOI.
- Nove nesinonimne heterozigotne varijante SOHLH2 gena specifične za žene iz Kine sa PPOI su: p.Glu79Lys (štetna), p.105Gly (štetna), p.Thr321Pro.
- Nove nesinonimne heterozigotne varijante SOHLH2 gena specifične za žene iz Srbije sa PPOI su: p.Leu120Phe, p.Leu204Phe. Promoter varijante c.530+6T>G, je varijanta koja najverovatnije ima štetan uticaj kod žena iz Srbije sa PPOI, jer utiče na spajanje RNK.
- Etički različiti narodi mogu da pokazuju razlike u putevima genske regulacije i gena koji uzrokuju PPOI.
- COLIA1 gen je jedan od mnogih gena koji utiču na karakteristike kosti. Može da deluje kao marker za razlike u kvalitetu i kvantitetu, krhkosti kostiju i ubrzanog gubitka koštane mase kod starijih žena. Kod mlađih žena sa PPOI COLIA1 gen ne može identifikovati one koji su u većoj opasnosti od osteoporoze.

7. LITERATURA

1. De Moraes-Ruehsen M, Jones GS: Premature ovarian failure (POF). *Fertil Ster*, 1967; 18:440-446.
2. Vujović S., Brincat M., Erel T, et al. EMAS position statement: Menaging women with POF. *Maturitas*, 2010;67:91-93.
3. Falsetti L, Scalichi S, Villant T, Bugari G: Premature ovarian failure. *Gynecol End*, 1999; 13:189-195.
4. Coulam CB: Autoimmune Ovarian Failure. *Semin Report Endocr*, 1983; 1:161-167
5. Van Kasteren YM, Handscheid RD, Smits AP, Cremers FP, van Zonneveld P, Bread DD: Familial idiopathic premature ovarian failure an ovenated and underestimated genetic disease. *Hum Reprod* 1999;14:2455-9.
6. Dixit H, Rao L, Padmalatha V et al. Genes governing premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online* 2010;20:724-40.
7. Qin Y, Zhao H, Xu J et al. Association of 8q22.3 locus in Chinese Han with idiopathic premature ovarian failure. *Hum Mol Genet* 2012;21:430-436.
8. Qin Y, Sun M, You L et al. ESR1, HK3 and BRSK1 gene variants are associated with both age at natural menopause and premature ovarian failure. *Orphanet J Rare Dis*:2012;7:5.
9. Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Kinght PG, Charlton HM. The effects of a null muttation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 2000;141:1795-1803.
10. Woad KJ, Prendergast D, Winship IM, Shelling AN. FSH receptorgene variants are rerely associated with premature ovarian failure. *Reprod Biomed online*.2003;26(4):396-399.
11. Woad KJ, Watkins WJ, Prendergast D, Shelling AN. The genetic basis of premature ovarian failure. *Aust N Z J Obstet Gynecol*.2006; 46(3):242-244.
12. Pu D, Xing Y, Gao Y, Wu J. Gene variation and premature ovarian failure a meta analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014 ;182:226-237.
13. Sheling AN, Burton KA, Chand AL, et al. Inhibin:a candidate gene of premature ovarian failure. *Hum Reprod* 2000;15(12):2644-2649.

14. Qin Y, Jiao X, Dalglish R, et al. Novel variants in the SOHLH2 gene are implicated in human premature ovarian failure. *Fertil Steril*.2014;101(4):1104-1109.e6.
15. Groswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Hum Reprod*.2005;11:391-410.
16. Bianco B, Nunes Lipay MV, Guades AD, Verreschi IT. Clinical implication of the detection of the Y chromosome mosaicism in Turners syndrome: report of 3 cases. *Fertil Steril*.2008;90(4):1197.e117-1197.e20.
17. Villanueva AL, Rebar RW. Triple X-syndrome and premature ovarian failure. *Obstet Gynecol*.1983;62(3suppl):70s-73s.
18. Shelling AN. Premature ovarian failure. *Reproduction*.2010;140(5):633-641.
19. Groswami R, Groswami D, KabraM, Gupta N, Dubey S, Dadhwal. Prevalence of the X syndrom in phenotypically normal women with premature ovarian failure and its association with autoimmune thyroid disorders. *Fertil Steril*.2003;80:1052-1054.
20. Sherman SL: Premature ovarian failure in the fragil X syndrome. *Am J Med Genet* 2000;97:189-94.
21. Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, et al. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1premutation. *Hum Reprod*. 2007;22:2142-2152.
22. Hergersberg M, Matsuo K, et al. Tissue-specific expression of a FMR1/beta-galactosidase fusion gene in transgenic mice. *Hum Mod Genet*.1995;4:359-366.
23. Hegerman RJ, Leavitt BR et all.: Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation. *Am J Hum Genet*, 2004 May; 75(5):1051-1057.
24. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Horm Res*. 2007;68: 196-202.
25. Simpson JL. Genetic and phenotypingheterogeneity in ovarian failure:overview of selected candidate genes. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1135:146-154.
26. Bione S, Rizzolio F, Sala C, Ricotti R, Goegan M, Manzini MC, Battaglia R, Marozzi A, Vegetti W, Dalpra L et al. Mutation analysis of two candidate genes

- for premature ovarian failure, DACH2 and POF 18. *Hum Reprod* 2004;19:2759-2766.
27. Dixit H, Rao LK, Padmalatha W, Kanakavalli M, Deenadaval M, Gupta N, Chakrabarty B, Singh L. Missense mutation in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet* 2006;119:408-415.
 28. Janice R, Ruth W, Karen B: Making decisions about hormone replacement therapy, *BMJ* 2004;326: 322-326.
 29. Haris S, Chand A, Winship I, Geršak K, Aittomaki K, Shelling A. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod*.2002;8:729-733.
 30. Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Rajkovic A. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet*.2007;81:576-581.
 31. Laurenco D, Brauner R, Lin I, et al. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Eng J Med*.2009;360:1200-1210.
 32. Persani L, Rossetti R, Cacciatore C. Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol*.2010;45:257-279.
 33. Jeyasuria P, Ikeda Y, Jamin SP, et al. Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol*.2004;18:1610-1619.
 34. Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*.2004;305:1157-1159.
 35. Zhao H, Chen ZJ, Qin Y, et al. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet*.2008;82:1342-1348.
 36. Ling I, Soyal SM, Dean I. FIGalpha. A germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development*.1997;124:4939-4947.
 37. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, et al. The murine winged-helix transcription factor FOXL2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*.2004;131:933-942.

38. Choi Y, Yuan D, Rajkovic A. Germ cell-specific transcriptional regulator SOHLH2 is essential for early mouse folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Biol Reprod.* 2008;79(6):1176-1182.
39. Zhao H, Li G, Dagleish R, Vujovic S, Ivanisevic M, et al. Transcription factor SOHLH1 is potentially associated with primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril* 2015;103(2):548-553-e5.
40. De Mattos CS, Trevisan CM, Peluso C, et al. ESR1 and ESR2 gene polymorphisms are associated with human reproduction outcomes in Brazilian women. *J Ovarian Res.* 2014;7:114.
41. Kolibianakis EM, Papanikolaou EG, Fatemi HM, Devroey P. Estrogen and folliculogenesis: is one necessary for the other? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17: 249-253.
42. Critchley H.O.D, Henderson T.A., Kelly R.W, Scobie G.S, Evans L.R, Groome N.P, Saunders P.T.K. Wild-Type Estrogen Receptor (ER beta 1) and the Splice Variant (ER beta cx/ beta2) Are Both Expressed within the Human Endometrium throughout the Normal Menstrual Cycle. *J.Clin. Endocrinol.* November 1, 2002; 87(11):5265-5273.
43. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabro A, Becherini L, Martini G and Nuti R. Estrogen receptor Gene Polymorphisms and the Genetics of Osteoporosis. *Am. J. Epidemiol.*, Feb 15, 2005;161(4): 307-320.
44. Syrrou M, Georgiou I, Patsalis PC, Bouba I, Adonakis G, Pagoulatos GN. Fragile X premutations and (TA)_n estrogen receptor polymorphism in women with ovarian dysfunction. *Am J Med Genet.* 1999; 84:306-308.
45. Bretherick KL, Hanna CW, Currie LM, Fluker MR, Hammond GL, Robinson WP. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2008; 89:318-324.
46. Xita N., Georgiou I., Lazaros L, Psofaki V, Kolios G, Tsatsoulis A. The role of sex hormone-binding globulin and progesterone receptor gene variants in the development of polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.*, March 1, 2008; 23(3): 693-698.

47. Ibanez L, Ong KK, Mmongan N, Jaaskelainen J, Marcos MV, Hughes I, Zegher F. Androgen Receptor Gene CAG Repeat Polymorphism in the Development of Ovarian Hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(5):1935-1945.
48. Chatterjee S, Singh R, Kadam S, Maitra A, Thangaraj K, Meherji P, Modi D. Longer CAG repeat length in the androgen receptor gene is associated with premature ovarian failure. *Hum Reprod* 2009; 24: 3230-3235.
49. Sugawa F, Wada Y, Maruyama T, Uchida H, Ishizuka B, Ogata t. Premature ovarian failure and androgen receptor gene CAG repeat lengths weighted by X chromosome inactivation patterns. *Fertil Steril* 2009; 91: 649-652.
50. Panda B, Rao L, Tosh D, Dixit H, Padmalatha V, Kanakavalli M, Raseswari T, Deendayal M, Gupta N, Chakiabarty B et al. Gremline study of AR gene of Indian women with ovarian failure. *Gynecol Endocrinol* 2011; 27: 572-578.
51. Stewart TL, Ralston HS. Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *J Endocrinol.* 2000; 106:235-245.
52. Grant SFA, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH, Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nature genetics.* 1996; 14:203-205.
53. Langdahl BL, Ralston SH, Grant SFA, Eriksen EF. A Sp1 binding site polymorphism in the COLIA1 gene predicts osteoporotic fractures in both men and women. *Am Soc Bone Min Res.* 1998; 139:1384-1389.
54. Aerssens J, Dequeker J, Peeters J, Breemans S, Broos P, Boonen S. Polymorphism of the VDR, ER and COLIA1 genes and osteoporosis hip fracture in elderly postmenopausal women. *Osteoporosis Int.* 2000; 11:583-591.
55. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcels S, Landahl BL, Lips P et al. Large scale-evidence for effects of the COLIA1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes the GENOMS study. *PloS Med.* 2006; 3e:90-97.
56. Hashimoto O, Moore RK, Shimasaki S. Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. *PNAS.* 2005;102:5426-5431.
57. Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celaste Aj, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol.* 1998.;12:1809-1817.

58. Tiotiu D, Avlaro Mercadal B, Imbert R et al. Variants of the BMP15 gene in a cohort with premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 2010;25(6):1581-1587.
59. Persani L, Rosseti R, Cacciatore C, Fabre S. Genetic defects of ovarian TGF- β -like factors and premature ovarian failure. *J Endocrinol Invest.* 2011;34:244-251.
60. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Rajendra Kumar T, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factors is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 1996;383:531-535.
61. Rah H, Joeon YJ, Ko JJ, et al. Assotiation of inhibin α gene promoter polymorphisms with risk of idiopathic primary ovarian insufficiency in Korean women. *Maturitas.* 2014;77(2):163-167.
62. Robertson DM, Cahir N, Findlay JK, Burger HG, Groome N. Biological and immunological characterization of inhibin forms in human follicular fluid and plasma. *J Clin Endocrinol.* 1997;82:889-896.
63. Dixit H, Deendayal M, Singh L. Mutational analysis of the mature peptide region of inhibin genes in Indian women with ovarian failure. *Hum Reprod.* 2004;19(8):1760-1764.
64. Marozzi A, Porta C, Vegetti W, et al. Mutation analysis of the inhibin alpha gene in cohort of Italian women affected by ovarian failure. *Hum Reprod.* 2002;17(7):1741-1745.
65. Chand AL, Harrison CA, Shelling AN. Inhibin and premature ovarian failure. *Hum Reprod Update.* 2010;16(1):39-50.
66. Corre T, Schuettler J, Bione S, et al. A large-scale association study to assess the impact of know variants of the human INHA gene on premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 2009;24(8):2023-2028.
67. Groswami D, Conway GS: POF. *Human Reprod Update*, Vol11, No4:391-410,2005.
68. Stigliani S, Anserini P, Nicoletti AJ, et al. Insight into the genomics of premature ovarian failure. *Mol Genet Med.* 2013;7(3).
69. Christin-Maitre S, Tachdijan G. Genome-wide association study and premature ovarian failure. *Ann Endocrinol.* 2010;71:218-221.

70. Knauff EAH, Blauw HM, Pearson PL, et al. Copy number variants on the X chromosome in women with primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril* 2011;95(5):1584-1588.e1.
71. Mc Guire MM, Bowden W, Engel NJ, Ahn HW, Kovanci E, Rajkovic A. Genomic analysis using high-resolution single-nucleotide polymorphism arrays reveals novel microdeletions associated with premature ovarian failure. *Fertil Steril*.2011;95(5):1595-1600.
72. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role of a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2011;409:363-366.
73. Murchison EP, Stein P, Xuan Z, et al. Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev*. 2007;21:682-693.
74. Dang Y, Zhao S, Qin J, Han T, Li W, Chen Z. Micro RNA-22-3p is down-regulated in the plasma of Han Chinese with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2015;103(3):802-807.e1.
75. Laissue P. Etiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: from genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Mol Cell Endocrinol*.2015;411:243-257.
76. Caburet S, Arboleda VA, Liano E, et al. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med*. 2014;370:943-949.
77. Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, et al. MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *Am J Hum Genet*. 2014;95:754-762.
78. AlAsiri S, Basit S, Wood-Trageser MA, et al. Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *J Clin Invest*. 2015;125(1):258-262.
79. Wang J, Zhang W, Jiang H, Wu BL. Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med*. 2014;370:972-974.
80. Harrison DG, Freiman PC, Mitchell GG et al.: Alterations of Vascular Reactivity in Atherosclerosis. *Circ Res*,1987; 61:7-80.
81. Vujović S: Menopauza. *Medicinski fakultet*, 1998; 268:93-94.

82. Juhan-Vague I, Alessi MC: Plasminogen activator inhibitor I and atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 1985; 70:138-143.
83. Centrella M, Canalis E: Local regulators of skeletal growth. *Endocr Rev*, 1985; 6:544-554.
84. Sands RH, Studd JW, Jones J and Alghband-Zadeh J: Comparison of the biochemical effects of testosterone and estrogen on bone markers in surgically menopausal women. *Gynecol End*. 2000; 14: 382-387.
85. Dewhurst CJ, De Koos EB, Ferreira HP: The resistant ovary syndrome. *Br J Obstet Gynecol*. 1975; 82: 341-345.
86. Jones GS, De Moraes-Ruehsen M: A new syndrom of amenorrhoea in association with hypergonadotropisam and apparently normal ovarian follicular apparatus. *Am J Obstet Gynecol*.1969; 104:597-600.
87. Dahl KD, Biesak TA, Hsueh AJ: Naturally occurring antihormones: secretion of FSH antagonists by women treated with GnRH analog. *Science*, 1988; 239:72-74
88. Tsirigotis M, Craft IL: Benign Thymoma and resitant ovary syndrome. *Br J Obstet Gynaecol*.1994; 101:350-352.
89. Muechler EK, Huang KE, Schenk E: Autoimmuniti in premature ovarian failure. *Int J Fertil*. 1991; 36:99-103.
90. Horner E, Fleming J, Studd J: A studyof women on long-term hormone replacement therapy and their attitude to the suggested cessation. *Climacteric*, Vol8, supp2, 2005;p.85
91. Remohi J, Gartner B, Gallardo E, YalilS, Simon Cpaillcer A: Pregnancy and birth rates after oocyte donation. *Fertil Steril*. 1997; 67:717.
92. Faber BM, Marcan R, Hamacher SJ, Toner JP: The impact of an egg donors age and her prior fertility on recipient pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 1997; 68:370.
93. Kauffman RP, Castracane VD: Premature ovarian failure associated with autoimmune polgladular syndrome: pathophysiological machanismus and future fertility. *J Wonens Health (Larchmt)*, 2003 Jun;12(5):513-533.

94. Howell WM, Jobs M, Gyllensten U, et al. Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms. *Nat Biotechnol.* 1999;17:87-88-
95. Howell WM, Jobs M, Brookes AJ. IFRET: an improved fluorescence system for DNA-melting analysis. *Genome Res* 2002;12:1401-1407.
96. Qin Y, Zhao H, Xu j et al. Association of 8q22.3 locus in Chinese Han with idiopathic premature ovarian failure. *Hum Mol Genet.* 2012;21:430-436.
97. Er TJ, Chang JG. High-resolution melting: applications in genetioc disorders. *Clin Chim Acta.* 2012;414:197-201.
98. World Health Organization. Assessment of the fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Reportof WHO study group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1994; 843:1-129.
99. Westberg L, Baghaei F, Rosmond R, Hellstrand M, Landen M, Jansson M, Holm G, Björntorp P, Eriksson E. Polymorphisms of the androgen receptors gene and estrogen receptors beta gene are associated with androgen levels in women. *J Cil Endocrinol Metab* 2001; 86:2562-2568.
100. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometros.*1992;48:361-372.
101. Van Meurs JBJ, Schuit SCE, Weel AEAM, et al. Association of 5´ estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Hum Mol Genet* 2003;12:1745-1754.
102. Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S et al. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PloS Genet* 2007;3:2023-2036.
103. Pan B, Chao H, Chen B, Zhang L, Li L, Sun X et al. DNA metylation ofgerm-cell-specific basic helix-loop-helix transcription factors, SOHLH2 and FIGL alpha during gametogenesis. *Mol Hum Reprod* 2011;17:550-561.
104. Trajkovic K, Perovic M, Tarasjev A, Pilipovic N, Kanazir S. Association of collagene type I alfa 1 gene polymorphism with bone mineral density in osteoporosis in Serbia. *J Womens Health.* 2009;7:1-5.

105. Yoon SH, Choi YM, Hong MA, Lee GH, Kim JJ, Im HJ, Min EG, Kang BM, Yoon BK, Moon SY. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms in patients with idiopathic premature ovarian failure. *Hum Reprod* 2010;25:283-287.
106. Tsukamoto K, Inoue S, Hosoi T, Orimo H, Emi M. Isolation and radiation hybrid mapping of dinucleotide repeat polymorphism at the human estrogen receptor beta locus. *J Hum Genet* 1998;43:73-74-
107. Nicolas Diaz-Chico B, German Rodriguez F, Gonzalez A, Ramirez R, Bilbao C, Cabrera de Leon A, Aguirre Jaime A, Chirino R, Navarro D, Diaz-Chico JC. Androgens and androgen receptors in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 105:1-15.
108. Tsezou A, Tzetis M, Gennatas C, Giannatou E, Pampanos A, Malamis G , et al. Association of repeat polymorphisms in the estrogen receptors alpha, beta (ESR1, ESR2) and androgen receptor (AR) genes with the occurrence of breast cancer. *Brest* 2008;17:159-166.
109. Cordts EB, Santos AA, Peluso C, et al. Risk of premature ovarian failure is associated to the Prull polymorphism at estrogen receptor gene ESR1. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:1421-1425.
110. Vilhjalmsosson BJ, Notborg M. The nature of confounding in genomic-wide association studies. *Nature Rev Genet* 2012;14:1-2
111. Liu L, Tan R, Cui Y, et al. Estrogen receptor alpha gene (ESR1) polymorphisms associated with idiopathic premature ovarian failure in Chinese women. *Gynecol Endocrinol* 2013;29:182-185.
112. Yang JJ, Cho LX, Lim YJ, et al. Estrogen receptor-1 genetic polymorphisms of the risk of premature ovarian failure and early menopause. *J Womens Health (Larcmt)* 2010;19:297-304.
113. Zhao XX, Suzumori N, Yamaguchi M, Suzumori K. Mutational analysis of the homeobox region of the human NOBOX gene in Japanese women who exhibit premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2005;83:1843-1844.
114. Qin Y, Shi Y, Zhao Y, Carson SA, Simpson JL, Chen ZJ. Mutation analysis of NOBOX homeodomain in Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2009;91:1507-1509.

115. Bouilly J, Bachelot A, Broutin I, Touraine P, Binart N. Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in large primary ovarian insufficiency cohort. *Hum Mutat* 2011;32:1108-1113.
116. Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* 2006;154:739-744.
117. Di pasquale E, Rosseti R, Marozzi A et al. Identification of new variants of human BMP15 gene in large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1976-1979.
118. Takebayashi K, Takakura K, Wang HQ, Kimura F, Kasahara K, et al. Mutation analysis of the growth differentiation factor-9 and -98 genes in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000;74:976-979.
119. Harris SE, Chand AL, Winship IM, Geršak K, Aittomaki K, Shelling AN. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 2002;8:729-733.
120. Bodega B, Porta C, Crosignani PG, Ginelli E, Marozzi A. Mutations in the coding region of the FOXL2 gene are not a major cause of idiopathic premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 2004;10:555-557.
121. Chatterjee S, Modi D, Maitra A et al. Screening for FOXL2 gene mutations in women with premature ovarian failure: an Indian experience. *Reprod Biomed Online* 2007;15:554-560.
122. Qin CR, Chen SL, Yao JL, Wu WQ. Haplotype and mutation analysis of the TGFBR3 gene in Chinese women with idiopathic premature ovarian failure. *Gynecol Endocrinol* 2012;28:63-67.
123. Dixit H, Rao KL, Padmalatha VV, et al. Mutation analysis of the betaglycan gene-coding region in susceptibility for ovarian failure. *Hum Reprod* 2006;21:2041-2046.
124. Hand AL, Robertson DM, Shelling AN, Harrison CA. Mutational analysis of betaglycan/TGF-betaRIII in premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2007;87:210-212.

125. Ojeda D, Lakhali B, Fonseca DJ, et al. Sequence analysis of the CDKN1B gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype. *Fertil Steril* 2011;95:2658.e1-2660.e1.
126. Wang B, Mu Y, Ni F, et al. Analysis of FOXO3 mutation in 114 Chinese women with premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online* 2010;20:499-505.
127. Watkins WJ, Umbers AJ, Woad KJ, et al. Mutational screening of FOXO3A and FOXO1A in women with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2006;86:1518-1521.
128. Group EARW, Fauser BC, Diedrich K, Bouchard P, Dominguez f, Matzuk M et al. Contemporary genetic technologies and female reproduction. *Hum Reprod Update* 2011;17:829-847.
129. Toyoda S, Miyazaki T, Miyazaki S, Yoshimura T, Yamamoto M, Tashiro F, et al. SOHLH2 affects differentiation of KIT positive oocytes and spermatogonia. *Dev Biol* 2009;325:238-248.
130. Qin Y, Zhao H, Kovanci E, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. Analysis of LHX8 mutation in premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2008;89:1012-1014.
131. Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart TL, Grant SF, Robins SP et al. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fractures by affecting bone density and quality. *J Clin Invest*. 2001; 107:899-907.
132. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Yue F, McGuigan FEA, Grant SF et al. Relation of alleles of the collagen type 1 gene to bone density and the risk of osteoporosis fractures in postmenopausal women. *New Engl. J Med*. 1998; 338:1016-1021.
133. Deng HV, Chen WM; Recker S, Stegman MR, Li JL; Davies KM et al. Genetic determination bone mass in women without colles fracture. *J Bone Min Res*. 2000; 15:1243-1252.
134. Liden M, Wilen B, Lunghall S, Melhus H. Polymorphism at the Sp12 binding site in the collagen type 1 alpha 1 gene does not predict bone mass density in postmenopausal women in Sweden. *Calcif Tissue Int*. 1998; 63:293-295.
135. Coulam CB, Amadson SC, Annegers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol*. 1986; 67:604-606.

136. Hadjidakis DJ, Kokkinakis EP, Sfakinakis ME, Raptis SA. Bone density patterns after normal and premature menopause. *Maturitas*. 2003;44:279-286.
137. Heegaard A, Jorgensen HL, Vestergaard AW, Hassager C, Ralston SH. Lack of influence of collagen tip 1 alpha 1 Sp1 binding site polymorphism on the rate of bone loss in a cohort postmenopausal Danish Women followed for 18 years. *Calcif Tissue Int*. 2000; 66:409-413.
138. Kobayashi N, Fujino T, Shiogene T, Furuta I, Kobamatsu Y, Yaegashi m et al. Estrogen receptor alpha polymorphism as a genetic marker for bone loss, vertebral fractures and susceptibility to estrogens. *Maturitas*. 2002; 41:193-201.
139. Kushner PJ, Agard DA, Green GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Ster Bioch Mol Biol*. 2000; 74:311-7.

BIOGRAFIJA

Maja Franić- Ivanišević rođena je 09.11.1976. godine u Beogradu. Završila je Prvu beogradsku gimnaziju 1995.god, sa odličnim uspehom. **Medicinski fakultet u Beogradu završila je u roku, u junu 2001.god.**, stekavši zvanje doktora medicine. Postdiplomske studije iz oblasti endokrinologije upisala je 2001., usmeni magistarski ispit položila oktobra 2004. god sa ocenom 10 (deset). **Specijalizaciju iz ginekologije i akušerstva počela je 2002. god.** na nastavnoj bazi Medicinskog fakulteta: Institutu za ginekologiju i akušerstvo, Kliničkog centra Srbije. Četvrtu godinu specijalizacije provela na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, kao lekar na specijalizaciji na određeno vreme. Magistarsku tezu radila je na Institutu za endokrinologiju KCS, kod mentora prof dr Svetlane Vujović, čiji je bila student. **Magistrirala na Medicinskom fakultetu u Beogradu, 2005.god i stekla zvanje magistra medicinskih nauka. Tema magistarskog rada:“Primarna prevremena insuficijencija ovarijuma i autoimune bolesti“.** Završila oba semestra škole ultrazvuka iz ginekologije na IGA KCS 2005. god. Završila kurs ultrazvuka dojke na Institutu za onkologiju i radiologiju 2005. god. **Položila specijalistički ispit sa ocenom odličan (5), 2006.god, stekavši zvanje specijaliste za ginekologiju i akušerstvo.** Zaposlena na neodređeno vreme na Institutu za ginekologiju i akušerstvo KCS od 2006. god. U oktobru 2008.god završila školu za Menopauzu u Barseloni u organizaciji Evropskog udruženja za menopauzu- EMAS. Završila školu kolposkopije 2009.god. Usavršavanje iz oblasti uroginekologije obavila je 2012. god u Sloveniji, na UKC Maribor, kod prof dr Igora Buta, u trajanju od 4 meseca.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a MAJA FRANIĆ - IVANIŠEVIĆ

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

«ANALIZA POLIMORFIZNA U GENIMA ZA RECEPTORE POLNIH STEROIDA KOD ŽENA SA PRIMARNOM PREVREMENOM INSUFICIJENCIJO JAJNIKA»

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.07.2016.

Franić Ivanišević Maja

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora MAJA FRANIĆ - IVANIŠEVIĆ

Broj upisa _____

Studijski program doktorske studije

Naslov rada: «ANALIZA POLIMORFIZNA U GENIMA ZA RECEPTORE POLNIH STEROIDA KOD ŽENA SA PRIMARNOM PREVREMENOM INSUFICIJENCIJO JAJNIKA»

Mentor Prof. Dr. Svetlana Vujović

Potpisani Prof. Dr. Vujović S.

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.07.2016.

Franić-Ivanišević Maja

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

«ANALIZA POLIMORFIZNA U GENIMA ZA RECEPTORE POLNIH STEROIDA KOD ŽENA SA PRIMARNOM PREVREMENOM INSUFICIJENCIJO JAJNIKA»

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.07.2016.

Travić Travićević M.