

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lukáš Landsmann

Změny v embryonálním programování vlivem *diabetes mellitus*  
Changes in embryonal programing induced by *diabetes mellitus*

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Gabriela Pavlínková, Ph.D.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.5.2015

Podpis

Lukáš Landsmann

## Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce RNDr. Gabriele Pavlíkové, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a trpělivost. Děkuji také Mgr. Radce Čerychové za odbornou pomoc při psaní bakalářské práce. Současně bych chtěl poděkovat své rodině za podporu a možnost studia na vysoké škole.

## **Abstrakt:**

Embryonální vývoj je citlivý ke změnám prostředí. Tyto změny mohou vést ke změnám v embryonálním programování. Změny v programování embrya mohou nastat v důsledku nedostatečné výživy, stresu, působením chemických látek a také vlivem diabetu. Maternální diabetes vede k diabetické embryopatii. Tato práce se zaměřuje na vliv diabetického prostředí na vývoj jedince. Práce shrnuje genetické a epigenetické mechanismy podílející se na vzniku diabetické embryopatie. Epigenom jedince citlivě reaguje na faktory životního prostředí regulací transkripční aktivity genů. Změny v epigenomu vedou ke změně exprese genů, což může mít negativní dopad na fyziologii a metabolismus organismu. Hyperglykémie vede ke změnám v epigenomu.

**Klíčová slova:** *Diabetes mellitus*, diabetická embryopatie, transkripční regulace, genetické a epigenetické faktory, embryonální programování, genom

## **Abstract:**

Embryonic development is sensitive to environmental changes. These changes may lead to changes in the embryonic programming. Changes in programming embryos can occur due to inadequate nutrition, stress, treatment with chemicals and also due to diabetes. Epigenome reacts sensitively to environmental factors regulating gene transcriptional activity. Changes in the epigenome lead to a changes in gene expression, which can have a negative impact on the physiology and metabolism of organism. Maternal diabetes may alter embryonic and fetal development and may result in diabetic embryopathy. Furthermore, maternal diabetic enviromental plays an important role in the predisposition of offspring to a number of chronic diseases later in life. The offspring of diabetic pregnancies demonstrate differences in metabolic, cardiovascular, and inflammatory variables, compared to the offspring of nondiabetic mothers. This thesis summarizes the genetic and epigenetic factors involved in the development of diabetic embryopathy and in the embryonic programming.

**Key words:** *Diabetes mellitus*, diabetic embryopathy, transcriptional regulation, genetic and epigenetic factors , embryonic programming, genome

## Obsah:

1. Seznam zkratk	7
2. Úvod:	9
3. Přehled literatury	10
3.1 <i>Diabetes mellitus</i>	10
3.1.1 <i>Diabetes mellitus</i> 1. typu	11
3.1.2 <i>Diabetes mellitus</i> 2. typu	12
3.1.3 Genetická predispozice k diabetu	12
3.1.4 Gestační <i>diabetes mellitus</i>	13
3.2 Mechanismy působení diabetu v buňce	14
3.3 Fetální programování	15
3.3.1 Vliv diabetu na těhotenství a potomka	16
3.4 Diabetické těhotenství rizikový faktor pro potomka	18
3.4.1 Diabetes a porodní váha novorozence	18
3.4.2 Metabolický syndrom	19
3.5 Diabetická embryopatie	20
3.5.1 Vliv diabetu na placentu	20
3.5.2 Prevence diabetické embryopatie	21
3.5.3 Model diabetické embryopatie	21
3.6 Transkripční faktory ovlivněné diabetem	23
3.6.1 Změny v expresi genu <i>HIF-1</i>	23
3.6.2 Změny v expresi genu <i>Pax3</i>	24
3.7 Epigenetika	25
3.7.1 DNA metylace	25
3.7.2 Modifikace histonů	27
3.7.3 RNA interference	28
4. Závěr:	29
5. Použitá literatura	30

## 2. Seznam zkratek

DM1	<i>Diabetes mellitus</i> 1. typu
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> 2. typu
GDM	Gestační <i>diabetes mellitus</i>
GAD	Dekarboxyláza kyseliny glutamové
LADA	Latentní autoimunitní diabetes projevující se v dospělosti
AGEs	Terminální produkty glykace
<i>Vegfa</i>	Vaskulární endoteliální růstový faktor A
PKC	Proteinkináza C
UDP-N-A	Uridindifosfát-N- acetylglucosamin
<i>Hif-1</i>	Hypoxií indukovaný faktor 1
<i>Pax3</i>	Paired box gene 3
IGF2	Insuline-like growth factor 2
IUGR	Nitroděložní růstová retardace plodu
<i>Pdx-1</i>	Pancreatic and duodenal homebox 1
miRNA	Micro RNA
O-GlcNAc	O-linked N- acetyl glucosamin
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
TGF- $\beta$	Transformující růstový faktor beta
HNF-4 $\alpha$	Hepatocytární jaderný faktor 4 alfa
DNMT	DNA metyltransferáza
H3K9me3	Histon-3 Lysin-9 tri-metylace
MLL5	Mixed lineage leukemia 5 gene

### 3. Úvod:

*Diabetes mellitus* je chápán jako metabolické onemocnění projevující se zvýšenou hladinou glykémie. Se zvyšující se incidencí diabetu stále přibývá těhotenství, které je komplikováno diabetem. I přes stále se zlepšující lékařskou péči je diabetes rizikovým faktorem pro dítě i matku. Diabetické těhotenství má v porovnání s normálním těhotenstvím zvýšené riziko novorozeneckého a kojeneckého úmrtí. Významnou roli ve vývoji jedince hraje fetální programování. V tomto období vývoje je zárodek extrémně citlivý k vlivům prostředí, je tzv. plastický. Diabetes jako negativní faktor těhotenství ovlivňuje fetální programování. Změny ve fetálním programování se projevují v pozdějších letech života. Maternální diabetes vede také k diabetické embryopatii, která se projevuje nejčastěji defekty srdce a neurální trubice (Becerra et al., 1990). Tyto abnormality mohou vést k předčasnému úmrtí plodu (Loffredo et al., 2001). Porodní váha, jak se ukázalo, může být rozhodujícím faktorem ovlivňujícím zdraví potomka v nadcházejících letech života. V mnoha případech nejsou po narození pozorovány žádné abnormality. Možným vysvětlením by mohla být genetická variabilita jedinců. Ovšem výskyt vrozených vad u potomků z diabetických těhotenství není rovnoměrný ani u inbredních jedinců, což svědčí o spoluúčasti další faktorů (Kappen and Salbaum, 2014). Další možnou nápovědou by mohla být již zmíněná náchylnost potomků diabetických matek ke kardiovaskulárním onemocněním, DM2, obezitě a metabolickému syndromu. Molekulární mechanismy diabetického těhotenství vedoucí ke zvýšenému riziku chronických onemocnění nejsou zcela jasné. Zdá se, že důležitou roli by mohla hrát epigenetická regulace, která je citlivá ke změnám prostředí. Důkazy o možných změnách epigenomu jedince vlivem diabetického prostředí v těhotenství jsou potvrzeny na myším modelu i lidech. Zvýšená incidence chronických onemocnění u potomků diabetiček je pravděpodobně spojená se změnami v jejich epigenomu v důsledku embryonálního programování.

## 4. Přehled literatury

### 4.1 *Diabetes mellitus*

*Diabetes mellitus* je metabolické onemocnění různé etiologie. Vzniká nedostatečnou sekrecí inzulínu nebo v důsledku neefektivního využití inzulínu, eventuálně možnými kombinacemi. Vždy se jedná o poruchu metabolismu sacharidů. U zdravého jedince je hladina glykémie v organismu přísně regulovaný parametr. Charakteristickým rysem diabetu je dysregulovaná hladina glykémie, projevující se jako hyperglykémie nebo hypoglykémie. Hormon inzulín se účastní metabolismu glukózy, snižování hladiny glykémie v krvi, tím zabraňuje vzniku hyperglykémie a ketoacidóze. Ketoacidóza vzniká v důsledku nedostatku inzulínu. Inzulín zvyšuje přísun glukózy do buněk prostřednictvím glukózového transportéru. Nedostatek inzulínu vede k hladovění buněk. Buňky jsou nuceny získávat energii prostřednictvím  $\beta$ -oxidace masných kyselin. Při štěpení mastných kyselin dochází k uvolňování ketolátek. Vysoká hladina ketolátek snižuje hladinu pH v krvi, což vede k porušení acidobazické rovnováhy. Výsledným projevem ketoacidózy je kómat a v některých případech i smrt jedince. Naopak nadbytek inzulínu snižuje hladinu glukózy a tak nadměrné vyplavení inzulínu vede ke stavu hypoglykémie. U rodiček, které jsou postiženy diabetem, se ketoacidóza vyvíjí rychleji než u netěhotných žen. Bylo doloženo, že tento efekt u těhotných žen je způsoben sníženou citlivostí na inzulín. Stav hypoglykémie se projevuje u pacientů pocením, pocitem hladu, tachykardií nebo usínáním. Nekontrolovaný diabetes vede k akutním i chronickým stavům, které ovlivňují délku i kvalitu života postiženého jedince. Chronickými komplikacemi diabetu jsou nefropatie, retinopatie a neuropatie, jenž patří k mikrovaskulárním komplikacím diabetu. Tyto komplikace mohou vést až k slepotě, k renálnímu selhání nebo k poškození periferního nervového systému. K dalším patologickým projevům diabetu náleží kardiovaskulární poruchy jmenovitě koronární srdeční onemocnění, srdeční selhání nebo kardiomyopatie. Diabetes patří k rizikovým faktorům vyvolávajícím a rozvíjejícím aterosklerotické komplikace vedoucí až k infarktu myokardu, mrtvici nebo k amputaci dolní končetiny. Diabetické těhotenství zhoršuje chronické komplikace diabetu. Progrese retinopatie během diabetického těhotenství vede ke zhoršení až ztrátě zraku pacienta (Chew et al., 1995). Během diabetického těhotenství dochází také ke zhoršení nefropatie. Trvalý pokles glomerulární filtrace byl zaznamenán u 45 % pacientů (Irfan et al., 2004). Striktní kontrola diabetu během těhotenství může snížit pravděpodobnost zhoršení chronických komplikací například zhoršení funkce ledvin (Rossing et al., 2002). Patologii diabetu nepůsobí pouze

samotné zvýšení hladiny glykémie, vedoucí k akutním stavům. Ale dlouhodobé působení hyperglykémie, které rozvíjí rizika chronických komplikací diabetu. Jedná se o komplexní patologický proces, který zahrnuje zvýšenou hladinu látek typu triglycidů, hydroxybutyrátů, reaktivních kyslíkových radikálů, somatomedinu a dalších sloučenin (Reece et al., 1996). Počet jedinců trpících diabetem v roce 2011 dosáhl dle Mezinárodní diabetické federace 366 milionů. V roce 2012 bylo odhadnuto WHO (Světová zdravotnická organizace), že v důsledku přímého vlivu diabetu zemřelo 1,5 miliónů osob (WHO, 2014). Počet jedinců postižených diabetem stále celosvětově roste, odhady pro následující období jsou alarmující. Předpokládá se, že incidence diabetu přesáhne v roce 2030 hranici 552 milionů osob trpící diabetem (Whiting et al., 2011). WHO diabetes mellitus rozděluje na několik typů *diabetes mellitus* 1. typu, *diabetes mellitus* 2. typu a další specifické typy diabetu. (WHO, 1999).

#### **4.1.1 *Diabetes mellitus* 1. typu**

*Diabetes mellitus* 1. typu (DM1) vzniká v důsledku destrukce  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu. Nejčastější příčinou zničení  $\beta$ -buněk jsou autoprotilátky proti  $\beta$ -buňkám. Přesný mechanismus není zcela znám. DM1 předchází zánětlivá reakce během, které dochází k infiltraci makrofágy, B-lymfocyty, CD4+ a CD8+ T-lymfocytů do Langerhansových ostrůvků. Možná příčina zániku  $\beta$ -buněk je prostřednictvím Fas receptoru, jenž se nachází na povrchu  $\beta$ -buněk. Na Fas receptor se váže ligand FasL umístěný na infiltrujících buňkách. Interakce Fas receptoru a FasL by mohla být spouštěčem selektivní apoptické smrti  $\beta$ - buněk v zanícených Langerhansových ostrůvcích a v konečném důsledku vést k DM1 (Moriwaki et al., 1999). Charakteristickým rysem DM1 je absence inzulínu vedoucí k hyperglykémii se sklonem k ketoacidóze. Pacienti s DM1 jsou závislí na léčbě pomocí inzulínu. DM1 se často manifestuje v průběhu dětství nebo dospívání. Některé případy DM1 jsou chybně řazeny mezi diabetiky 2. typu. Tento paradox potvrzuje studie provedená na jedincích ve věku 25 – 65 let, u kterých byl diagnostikován *diabetes mellitus* 2. typu (DM2). Chybně zařazení jedinci vykazovali nedostatek inzulínu, nebo přítomnost protilátek s charakteristickým rysem pro DM1 (Turner et al., 1997). Tento typ diabetu je označována jako LADA (z anglického „latent autoimmune diabetes of adults). LADA je onemocnění, které se projevuje v kterémkoliv věku, progresse tohoto onemocnění je pozvolná.

Incidence DM1 stále roste. Předpokládá se, že v letech 2005 – 2020 se v Evropě zvýší výskyt DM1 u dětí mladších pěti let až dvojnásobně (Patterson et al., 2000).

Charakteristickým rysem pro pacienty s DM1 je přítomnost protilátek v krvi. V některých případech nejsou protilátky detekované, proto hovoříme o takzvaném idiopatickém diabetu. Prevence DM1 není zcela možná. Genetická složka představuje přibližně 50 rizikových lokusů (genů), které zvyšují riziko vývoje DM1 (Pociot et al., 2010).

### **4.1.2 *Diabetes mellitus 2. typu***

Nezdravý životní styl vedoucí k obezitě a dalším civilizačním chorobám přispívá i k nárůstu incidence DM2. Příčinou vzniku DM2 je porucha v působení inzulínu nebo částečný defekt v sekreci inzulínu. DM2 nemusí být léčen pomocí inzulínu jako je to v případě DM1. Léčba spočívá především v podávání per-orálních antidiabetik a nastavení nízkoenergetické diety. Projev DM2 je méně výrazný, proto diagnóza DM2 bývá stanovena po několika letech. Postihuje nejčastěji dospělé jedince, obvykle ve věku nad 40 let. Stále častěji se vyskytuje u mladších jedinců. Při vzniku DM2 hraje roli kombinace genetických predispozic, environmentálních faktorů a v poslední době se ukazuje být důležitá epigenetická regulace. Při vývoji glukózové intolerance sehrávají důležitou roli různé dysfunkce orgánů například slinivky břišní ( $\beta$ - a  $\alpha$ -buňky), jater, svalů, tukové tkáně, gastrointersticiálního traktu, ledvin a mozku (DeFronzo, 2009). DM2 je onemocnění s multifaktoriální etiologií, kde důležitou roli hrají genetické predispozice, často aktivované negenetickými vlivy (Poulsen et al., 1999). Pomocí celogenomových asociačních studií bylo zjištěno, že genetická složka představuje více než 40 rizikových lokusů zvyšující riziko vzniku DM2 (McCarthy, 2010). Rodičky s DM2 mají dvojnásobně zvýšené riziko narození mrtvého dítěte. Dále dva a půlkrát zvýšené riziko perinatální úmrtnosti, tři a půlkrát zvýšené riziko úmrtnosti novorozence, šestkrát vyšší riziko úmrtnosti dítěte do prvního roku a v neposlední řadě mají rodičky s DM2 až jedenáctkrát vyšší riziko vrozených vad u svých potomků (Dunne et al., 2003).

### **4.1.3 Genetická predispozice k diabetu**

Dědičnost diabetu je ovlivňována různými faktory a není zcela známá. Genetická složka vysvětluje pouze 5 – 10 % dědičnosti diabetu. Důležitou roli v dědičnosti diabetu hraje epigenetika. K epigenetickým změnám může docházet v důsledku vlivu environmentálního faktorů působících na jedince ovlivněním metabolismu. Epigenetické mechanismy ovlivňují

fenotyp, aniž by ovlivňovaly genotyp jedince, nepůsobí tedy změny v sekvenci nukleotidů. Epigenetické mechanismy zasahují na úrovni transkripční a post-transkripční aktivity genů. Přesněji řečeno, zahrnují metylace DNA, modifikace histonů a RNA interferenci. Za epigenetický znak je považován stabilní, dědičný fenotyp epigenetické modifikace vedoucí ke změně na chromozomu, nikoliv v DNA sekvenci (Berger et al., 2009). Tím epigenetické mechanismy ovlivňují celou paletu buněčných procesů. Epigenetické změny se mohou přenášet na potomky.

Těhotné ženy s DM1 nebo DM2 jsou označovány vzhledem k vlivu na potomka jako pregestační diabetičky.

#### **4.1.4 Gestační *diabetes mellitus***

Gestační *diabetes mellitus* (GDM) je asymptomatické onemocnění, které může vést k poškození plodu během těhotenství. Jde o poruchu zpracovávání sacharidů vyvíjející se nejčastěji ve druhé polovině těhotenství. GDM vzniká, pokud tělo matky není schopné dodat a použít dostatek inzulínu pro optimální vývoj těhotenství. K rizikovým faktorům přispívající k GDM je stále zvyšující se věk rodiček a nezdravý životní styl vedoucí k obezitě (Solomon et al., 1997). Ženy s nadváhou mají až dvojnásobně vyšší riziko rozvoje GDM. U obézních žen je riziko rozvoje GDM až čtyřnásobné (Chu et al., 2007). Hladina inzulínu v průběhu těhotenství fyziologicky kolísá. Neléčený GDM je rizikovým faktorem pro matku i dítě. Prevalence GDM se podstatně liší mezi populacemi v rozsahu 1,7 %-11,6 % těhotných žen v závislosti na etnickém původu a věku těhotné ženy (Schneider et al., 2012). K náchylným etnickým skupinám patří Hispánci, původní obyvatelstvo Ameriky a Asiaté (Berkowitz et al., 1992). Stále častěji rodí ženy ve vyšším věku. Bylo prokázáno, že se zvyšujícím se věkem rodičky se zvyšuje riziko vzniku poruchy glukózové tolerance nebo výskytu gestačního diabetu u těhotné ženy (Sharpe et al., 2005).

GDM v posledních 4 – 8 týdnech těhotenství zvyšuje riziko makrosomie a úmrtí plodu. Potomci žen s GDM mají zvýšené riziko vzniku obezity a abnormální glukózové intolerance. Až 52,7 % žen s GDM mělo po 8 letech diagnostikován DM. Zvýšené riziko je zejména u rodiček s protilátkami proti dekarboxyláze kyseliny glutamové (GAD) receptorům a hodnotou BMI vyšší než 30 (Lobner et al., 2006). Ženám s gestačním diabetem by měla být vyšetřována hladina glykémie v 6. – 8. týdnu po porodu a poté každé 3 roky (Amer Diabet, 2000).

## 4.2 Mechanismy působení diabetu v buňce

Jak již bylo uvedeno výše, diabetes zvyšuje riziko amputace dolní končetiny, ztráty zraku, srdečního selhání nebo mrtvice. Tyto patologie jsou způsobeny zvýšenou hladinou glykémie. Existuje několik možných mechanismů, jakým způsobem hyperglykémie poškozuje buňky. Prvním možným mechanismem je snížení hladiny NADPH v buňce. NADPH je kofaktorem pro aldolázovou reductázu, která přeměňuje nadbytečnou glukózu v buňce na sorbitol (Lee et al., 1995). Sorbitol je v dalších reakcích přeměněn na fruktózu pomocí sorbitol dehydrogenázy. NADPH je využíván jako kofaktor pro regeneraci redukovaného glutathionu. Nízká hladina redukovaného glutathionu vede k nárůstu oxidativního stresu v buňce. Druhým mechanismem poškození tkání diabetem je tvorba terminálních produktů pokročilé glykace (AGEs, z anglického: „Advanced glycation endproducts“), vznikajících neenzymaticky. AGEs reagují s aminoskupinami intracelulárních a extracelulárních proteinů. Tím modifikují a narušují jejich funkci. AGEs mohou působit i jako ligandy vážící se na receptory. Příkladem je stimulace vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF, z anglického: „Vascular endothelial growth factor“) prostřednictvím AGEs (Lu et al., 1998). Hyperglykémie v buňce zvyšuje hladinu druhého posla, který dále aktivuje proteinkinázu C (PKC). Syntéza diacylglycerolu (DAG) probíhá převážně *de novo* v důsledku hyperglykémie (Xia et al., 1994). PKC hraje důležitou roli v buněčné signalizaci, proto aktivace hyperglykémie v buňce může vést k různým patologiím, které jsou zprostředkované PKC. Aktivace PKC může vést ke zvýšené propustnosti cév a neovaskularizaci v důsledku aktivace VEGF (Williams et al., 1997). Poslední mechanismus hrající roli v patogenezi diabetu je hexosaminová dráha. Při glykolýze je část fruktóza-6-fosfátu spotřebována na vznik signální molekuly uridindifosfát-N-acetylglukosamin (UDP-N-A). Hyperglykémie vede k nadměrné syntéze UDP-N-A, která modifikuje serinové a threoninové postranní zbytky transkripčních faktorů. Nadměrná syntéza UDP-N-A vede indukci transformujícího růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ , z anglického: Transforming growth factor beta) v mesangiálních buňkách ledvin (Kolm-Litty et al., 1998). TGF- $\beta$  ovlivňuje genovou expresi.

### 4.3 Fetální programování

Fetální vývoj je komplexní proces zahrnující řadu dějů. Samotný proces programování zahrnuje kritické období pro embryo. Embryo je plastické a vysoce citlivé k vnějším vlivům prostředí (Lucas, 1991). Prostor v děloze hraje důležitou roli při vývoji jedince. Jedinci vystavení extrémním podmínkám v nitroděložním prostředí vykazují po narození známky abnormální porodní váhy, délky, tělesných proporcí a hmotnosti placenty. V posledních letech se také objevují studie, které naznačují, že jedinci vystavení změnám v nitroděložním prostředí mají predispozice k chronickým onemocněním v pozdějších letech života, zejména k DM2, obezitě, metabolickému syndromu a kardiovaskulárním onemocněním. Tyto chronické komplikace mohou vést k předčasnému úmrtí jedince. Častější je i zvýšený výskyt rizikových faktorů pro tyto choroby jako je hypertenze, intolerance glukózy a hyperlipidémie (Harding, 2001).

Negativní vlivy projevující se ve fetálním programování mohou být například změny ve výživě matky, stres matky nebo *diabetes mellitus*. Tyto změny nemusí být patrné ihned po narození, často dochází k projevu v pozdějších etapách života. To vše může být spojeno s nutriční nevyrovnaností během těhotenství, vlivem maternálního *diabetes mellitus*.

Potomci těhotných žen vystavených nepříznivým podmínkám v průběhu první poloviny těhotenství v důsledku nedostatku živin, vykazují zvýšenou míru obezity (Ravelli et al., 1976). Obezita je rizikovým faktorem pro vznik DM2. Nedostatečný přísun potravy v těhotenství způsobené například hladomorem má vliv i na zvýšené riziko vzniku hyperglykémie a DM2 u potomka v dospělosti (Li et al., 2010). Spojitost mezi nedostatečnou výživou v těhotenství a výskytem glukózové intolerance, dyslipidemie, hypertenze nebo kardiovaskulárních chorob u potomků v dospělosti není zcela jasná (Stanner et al., 1997). U zvířecích modelů bylo prokázáno, že diabetické nitroděložní prostředí způsobuje zvýšený krevní tlak a sníženou glomerulární filtraci u zárodků vyvíjejících se v těle matky (Martins et al., 2014). Potomci vystavení diabetickému prostředí mají v dospělosti sníženou glukózovou toleranci a defektní inzulínovou odpověď, nezávisle na genetické predispozici k DM2 (Sobngwi et al., 2003).

Rodičovský diabetes má vliv na potomka. Vliv diabetu na potomka během těhotenství je teratogenní. Nadměrná sekrece inzulínu v děloze matky hraje důležitou roli ve zvýšeném výskytu abnormální glukózové tolerance v období adolescence potomka (Silverman et al., 1995). Maternální diabetes je faktorem, který ovlivňuje negativně vývoj jedince během

těhotenství. Další studie ukazují vliv diabetu otce na potomka. Potomci diabetických otců mají nižší porodní váhu než potomci otců bez diabetu (Lindsay et al., 2000). Výsledkem změny fetálního programování vlivem diabetu může být i zvýšené riziko vzniku rakoviny (Wu et al., 2012).

### **4.3.1 Vliv diabetu na těhotenství a potomka**

*Diabetes mellitus* postihuje přibližně 1 % všech těhotenství. Komplikace spojené s diabetickým těhotenstvím jsou pro všechny typy diabetu totožné. Hlavním činitelem ovlivňující potomka je hladina glykémie (Metzger et al., 2008). Prevalence výskytu vrozených vad u dětí matek s diabetem je nezávislá na etnickém nebo jiném demografickém původu (Sharpe et al., 2005). Diabetes neovlivňuje pouze tělesné zdraví potomků. Diabetické prostředí ovlivňuje nepříznivě některé neurologické funkce u dětí ve školním věku (Ornoy et al., 1998). Potomci ovlivnění diabetickým prostředím v děloze matky mají až dvojnásobně vyšší riziko vzniku poruchy pozornosti s hyperaktivitou (ADHD) v 6 roce života (Nomura et al., 2012).

Nejzávažnější komplikací diabetického těhotenství je diabetická embryopatie. Mezi nejčastěji se vyskytující abnormality plodu patří defekty srdce, neurální trubice a syndrom kaudální regrese.

Rozhodujícím faktorem je vliv diabetu na organogenezi plodu, která probíhá od 8. týdne těhotenství do 12. týdne těhotenství u člověka. U myši organogeneze probíhá během prvních 7 – 10 dnů. Jestliže dochází k projevu diabetu v období organogeneze, pak dochází k diabetické embryopatii. Pozdější vliv diabetu na embryo působí zvýšené riziko intrauterinní růstové restrikce, asfyxie – dušení plodu až fetální smrt.

Riziko perinatální morbidity se zvyšuje se zvyšující se hladinou glykémie lineárně (Landon et al., 2011). Se vzrůstající hladinou glykémie se také zvyšuje riziko vývojových vad plodu diabetické matky (Kitzmilller et al., 1991; Miller et al., 1981; Schaefer-Graf et al., 2000). Rostoucí hladina glykémie zvyšuje hladinu glykovaného hemoglobinu. Glykovaný hemoglobin se využívá v klinické praxi jako parametr kompenzace diabetika, protože odráží dlouhodobou hladinu glykémie. Vysoká hladina glykovaného hemoglobinu (HbA1c) v prvním trimestru zvyšuje pravděpodobnost výskytu diabetické embryopatie a dalších komplikací těhotenství (Greene et al., 1989; Todorova et al., 2005). Více než jednu polovinu úmrtí potomků diabetických matek v perinatálním období lze připsat malformacím plodu

(Greene, 1999). Přítomnost abnormalit plodu vlivem gestačního diabetu je v porovnání s pregestačním diabetem nižší (Shand et al., 2008). Matky s pregestačním diabetem mají desetkrát zvýšené riziko, že jejich potomek bude mít vrozenou vadu a pětinašobně vyšší pravděpodobnost úmrtí oproti běžné populaci (Casson et al., 1997). Pre-gestační diabetes mellitus zvyšuje až pětkrát riziko kardiovaskulárních malformací plodu (Wren et al., 2003). Nejčastěji jde o defekty endokardiálních polštářků, septa komor a spojení arteriového trunku. K vývoji plodu s patologickou ventrikulární hypertrofií jsou náchylnější potomci matek s pregestačním diabetem než potomci matek s gestačním diabetem (Ullmo et al., 2007). Ženy s pregestačním diabetem mají zvýšené riziko porodu císařským řezem, častější komplikovaný porod v důsledku dystokie ramének plodu při vaginálním porodu a výskyt gestační hypertenze nebo toxémie (Ray et al., 2001).

Gestační diabetes se vyvíjí ve druhé polovině těhotenství, proto nedochází k vývoji vrozených vad jako u potomků matek s pregestačním diabetem (Sheffield et al., 2002). Přesto ale dochází k různým komplikacím těhotenství vlivem gestačního diabetu.

## 4.4 Diabetické těhotenství rizikový faktor pro potomka

Způsob, jakým ovlivňuje diabetes vývoj jedince, není stále plně objasněn. Důležitou roli zde hraje kombinace genetických a epigenetických faktorů. Jedním z negativních projevů diabetického těhotenství je ovlivnění růstu plodu. Tento efekt se projevuje negativním způsobem na změně porodní váhy nebo predispozicím k metabolickému syndromu.

### 4.4.1 Diabetes a porodní váha novorozence

Maternální diabetes má vliv na porodní váhu jedince a to buď snížením, nebo zvýšením porodní váhy novorozence. Zvýšená porodní váha se projevuje jako makrosomie plodu. Důležitou roli v abnormálním růstu plodu vedoucí k makrosomie hraje hyperinzulinémie a inzulinový růstový hormon 1 (IGF-1)(Lauszus et al., 2001; Schwartz et al., 1994).

Vlivem diabetu může také docházet ke snížení proliferace buněk v zárodku, což vede k nízké porodní váze (Hales et al., 1991). Snížená porodní hmotnost je nalézána zejména u silných diabetiček s nefropatií. Nízká porodní váha je všeobecně rizikovým faktorem zvyšující morbiditu a mortalitu novorozenců (McIntire et al., 1999), náchylnost jedince k různým onemocněním v dospělosti. Zejména vede ke zvýšenému riziku vzniku ischemické choroby srdeční, cévní mozkové příhody, hypertenze a DM2 (Joss-Moore and Lane, 2009). Nízká porodní váha u mužů vede k projevu zvýšené inzulinové rezistence v játrech (Brons et al., 2008). Zvýšená inzulinová rezistence v játrech je předstupeň vývoje DM2. Diabetické nitroděložní prostředí, vedoucí k nízké, nebo k nadměrné porodní váze vede k narušení glukózové homeostáze a k pozdějšímu vývoji DM2 a obezity (Monrad et al., 2009; Simmons et al., 2001). To jakým způsobem dochází k ovlivnění porodní váhy vlivem diabetického prostředí, není zcela jasné. Některé rizikové alely pro DM2 jsou spojeny se snížením porodní váhy. Tedy genotyp plodu by mohl mít přímý vliv na porodní váhu jedince (Freaty et al., 2009). Hmotnost plodu po narození je ovlivněna genetickými i negenetickými faktory. Dědičnost porodní váhy se odhaduje dle studie na dvojčatech přibližně na 38 %. Spojitost mezi inzulinovou rezistencí a porodní váhou jako negenetickým faktorem byla potvrzena (Grunnet et al., 2007). Ženy narozené s nízkou porodní váhou vykazují zvýšené riziko vzniku gestačního diabetu. Nezralost a nízká porodní váha vzhledem ke gestačnímu věku jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku gestačního diabetu u potomka a onemocněním cév

dělohy zvané preeklampsie. Stejně jako nízká porodní, tak i vysoká porodní hmotnost je spojena se zvýšeným rizikem rozvoje gestačního diabetu u potomka (Rogvi et al., 2012).

#### **4.4.2 Metabolický syndrom**

Jak již bylo uvedeno, diabetické prostředí ovlivňuje vývoj jedince a působí změny v programování embrya. To má za následek zvýšené riziko vzniku obezity, DM2, kardiovaskulárních onemocnění a například metabolického syndromu. Metabolický syndrom je spojení různých onemocnění a rizikových faktorů, které společně vedou ke zdravotním komplikacím, jakou je mrtvice nebo srdeční infarkt. Mezi znaky metabolického syndromu patří inzulínová rezistence, abdominální obezita, arteriální hypertenze, snížená hladina HDL a zvýšená hladina cholesterolu. Zvýšený příjem sacharidů v těhotenství může zvyšovat pravděpodobnost výskytu symptomů typických pro metabolický syndrom u potomků v dospělosti (Danielsen et al., 2013). Epidemiologické studie ukazují, že jedinci vystavení diabetickému prostředí v těle matky jsou náchylnější ve vyšším věku k metabolickému syndromu (Boney et al., 2005). S rostoucí hladinou glukózy na lačno se zvyšuje riziko vzniku metabolického syndromu u potomka. Potomci diabetiček mají dvojnásobně vyšší riziko vzniku obezity v dospělosti. Riziko vzniku metabolického syndromu u potomků diabetiček je až čtyřnásobné (Clausen et al., 2009).

## 4.5 Diabetická embryopatie

Zvýšená hladina glukózy působí negativně na vývoj plodu. Mezi nezávažnější projevy diabetu na embryo je považována diabetická embryopatie. Diabetická embryopatie ovlivňuje vývoj všech orgánových soustav. Nejčastěji způsobuje defektní vývoj centrální nervové soustavy, kardiovaskulárního systému a vylučovacího systému plodu. Nejčastější vývojové vady spojované s diabetickou embryopatií jsou defekty srdce a neurální trubice (Becerra et al., 1990; Mironiuk et al., 1997).

Mechanismus diabetické embryopatie není znám. Hyperglykémie mimo jiné přispívá k tvorbě reaktivních forem kyslíku. Volné radikály mohou způsobit změny v metylaci DNA (Weitzman et al., 1994). Aktivace oxidačního stresu vlivem diabetu vede k apoptóze a k embryonální dysmorfogenezi (Yang et al., 2008). Jedno z možných vysvětlení proč dochází k defektu neurální trubice je, že diabetes narušuje metabolismus kyseliny arachidonové a myoinositolu, což vede k nedostatku prostaglandinů, které jsou důležité pro uzavření neurální trubice (Baker et al., 1990). Jedná se často o kombinaci několika vrozených vad, které se vyskytují v diabetické embryopatii jako jsou kardiovaskulární defekty, ageneze ledvin, obstrukční abnormality ledvin a dalších vrozených vad (Correa et al., 2008; Nielsen et al., 2005).

Vlivem diabetu dochází ke změně transkripčního profilu embrya (Pavlinkova et al., 2009). Ovlivněnými geny jsou geny kódující transkripční faktory, proteiny kódující chromatinové modifikace nebo proteiny zapojené do signálních drah transkripce. Právě tyto změny by být hlavní příčinou embryopatie.

### 4.5.1 Vliv diabetu na placentu

Diabetická embryopatie ovlivňuje funkci placenty. Hlavní funkcí placenty je vyživování plodu, výměna dýchacích plynů, sekrece hormonů a také imunologická bariéra. Diabetes ovlivňuje transkriptom placenty (Radaelli et al., 2003). Studie poukazující na změny v transkriptomu placenty prokázala dvě hlavní skupiny genů, které byly ovlivněné diabetem. Jsou to změny v transkripci genů regulující zánětlivé reakce a endoteliální reorganizaci. Vlivem diabetu dochází k jejich zvýšené expresi, což odráží stav chronického zánětu s příznaky vaskulární dysfunkce (Radaelli et al., 2003). Placenty z diabetických těhotenství vykazují histologické abnormality ve srovnání s placentami z normálních těhotenství

(Daskalakis et al., 2008). Změny vyvolané diabetem v placentě mohou způsobit zvýšený výskyt abnormalit plodu.

### 4.5.2 Prevence diabetické embryopatie

Diabetická embryopatie je výsledkem teratogenního působení diabetu v raném stádiu plodu (Mills et al., 1979). Pochopení mechanismu diabetické embryopatie je důležité k vypracování různých strategií vedoucích ke snížení nepříznivého efektu diabetu na vývoj plodu. Léčbou diabetu a pravidelnými kontrolami glykémie mohou těhotné ženy snižovat riziko vzniku diabetické embryopatie. Jedním z projevů diabetu je hyperglykémie. Hyperglykémie zvyšuje hladinu ROS v buňce. Zvýšená hladina ROS může vést k poškození membrán nebo DNA plodu. Užívání látek eliminujících radikály může mít anti-teratogenní efekt při perikoncepčním použití. Mechanismus působení vybraných vitamínů spočívá v antioxidačním účinku, například vitamínu E, vitamínu C (Cederberg et al., 2001), dále mastné kyseliny jako kyselinu lipoovou, kyselinu arachidonovou a kyselinu listovou (Czeizel and Dudas, 1992; Reece et al., 1998; Wiznitzer et al., 1999). Kyseliny listová a lipoová snižují zejména riziko vzniku defektů neurální trubice. Některé studie naznačují, že *diabetes mellitus* narušuje metabolismus kyseliny listové. Pokles hladiny kyseliny listové vede k defektům neurální trubice. Embrya vystavená diabetickému prostředí vykazují sníženou hladinu mRNA kódující transportér kyseliny listové (Wentzel et al., 2005). Kyselina listová může mít vliv na metylaci DNA (Jacob et al., 1998) a tím ovlivňovat epigenom zárodku. Doplnění kyseliny listové může zabránit až 72 % výskytu defektů neurální trubice (MRC, 1991). Matky s pregestačním diabetem, které neužívaly kyselinu listovou jako potravinový doplněk, mají dvojnásobně vyšší riziko vzniku defektů plodu než matky užívající doplněk stravy obsahující kyselinu listovou (Correa et al., 2012).

### 4.5.3 Model diabetické embryopatie

Při studiu diabetické embryopatie je využíváno zvířecích modelů nebo tkáňových kultur. Mezi nejčastěji užívaný model patří myší model (Leiter, 1989), který je nezbytný pro mechanistické studie lidských vrozených vad. Diabetická myš je klasifikovaná pokud její hladina glykémie je nad 13.9 mmol/l. Výzkum na zvířecích modelech ukázal, že maternální hyperglykémie vede k trvalému narušení sekreční kapacity  $\beta$ -buněk pankreatu, k abnormální

inzulínové signalizaci, ke změnám v energetické regulaci a k obezitě, ke kardiovaskulárním anomáliím zahrnující zvýšený krevní tlak, abnormální srdeční tep a morfologické defekty u potomků. Myší modely diabetu mohou být vytvářeny buď chirurgicky odstraněním slinivky, chemickou indukci, nebo knockoutem genů či selekcí například pro recesivní mutaci genu *ob*.

Chemická indukce diabetu využívá nejčastěji látku streptozotocin (Junod et al., 1969). Užití streptozotocinu vede k selektivní destrukci  $\beta$ -buněk pankreatu. Model odpovídá DM1, při kterém dochází k zničení  $\beta$ -buněk a při zničení  $\beta$ -buněk během těhotenství simulujeme model pregestačního diabetu. Jak již bylo zmíněno diabetes vede k deregulaci genové exprese. Pro studium funkce deregulovaného genu je využívána technologie knockout.

## 4.6 Transkripční faktory ovlivněné diabetem

Maternální diabetes ovlivňuje transkriptom embrya. Převážná většina genů, které ovlivňuje maternální diabetes nese potenciální vazebná místa pro transkripční faktory, které se účastní reakce na oxidativní stres a hypoxii (Pavlinkova et al., 2009). Jeden z mnoha genů, které jsou ovlivněny diabetem kóduje transkripční faktor HIF-1 (z anglického: „hypoxia-inducible factor), který reaguje na hypoxii ve tkáních (Wang and Semenza, 1993). Další transkripční faktor ovlivněný diabetem je PAX3 (z anglického: paired box protein 3).

### 4.6.1 Změny v expresi genu *HIF-1*

Pomocí zvířecích modelů bylo zjištěno, že diabetes způsobuje hypoxii a oxidativní stres ve tkáních. Fyziologická hypoxie hraje při vývoji jedince důležitou roli. Umožňuje proliferaci různých typů buněk, které by bez hypoxie nemohly proliferovat. Jsou to například specializované buňky placenty, cytotrofoblasty (Genbacev et al., 1997). Rychle rostoucí embryo se dostává do fyziologické hypoxie ve stádiu blastocysty, kdy je zásobeno kyslíkem pomocí difúze (Fischer and Bavister, 1993; Rodesch et al., 1992). Podle dosavadních studií může hrát hypoxie důležitou roli v diabetické embryopatii. Vlivem maternálního diabetu na plod se zvyšuje hypoxie plodu. Hypoxie plodu je spojena se zvýšeným výskytem defektů neurální trubice. Naopak zvýšení hladiny kyslíku zvané hyperoxie snižuje výskyt defektů neurální trubice (Li et al., 2005). Samotná hypoxie vyvolává oxidativní stres, který vede k poškození buněk. Tyto závěry jsou potvrzeny výsledky z praxe, kdy snížením oxidačního stresu pomocí perikoncepčního podávání antioxidantů vede k snížení výskytu diabetické embryopatie (Cederberg et al., 2001; Sharma and Buettner, 1993). V celém organismu je udržována homeostáze mezi oxidací a redukcí. Patologický oxidativní stres a hypoxie vede k narušení této homeostázy. Organismus reaguje na tyto změny pomocí oxidačně a redukčně citlivého transkripčního faktoru HIF-1. HIF-1 je heterodimerní transkripční faktor, který je složený ze dvou podjednotek HIF-1 $\alpha$  a HIF-1 $\beta$  (Arnt). Aktivovaný HIF-1 $\alpha$  reguluje geny vedoucí k vytvoření krevních ostrůvků ve žlutkovém váčku. Pro svoji aktivaci a stabilizaci využívá HIF-1 $\alpha$  reaktivní kyslíkové radikály, které jsou produkovány zejména v mitochondriích v důsledku nadměrného příjmu energie. Diabetes dysreguluje geny, které se podílejí na vývoji srdce. Tato dysregulace může vytvářet prostor pro defekty srdce (Pavlinkova et al., 2009). Mezi tyto geny patří i *Hif-1 $\alpha$* . V této studii bylo zjištěno, že diabetes mění expresní profil přibližně 500 genů. Použitím heterozygotního mutantu *Hif-1 $\alpha$ <sup>+/-</sup>* byla

prokázána spojitost maternálního diabetu s transkripčním faktorem HIF-1. Jeho částečná delece vede ke zvýšení výskytu defektů srdce, nejčastěji ventrikulárního defektu septa, který byl nalezen v 65 % všech kardiovaskulárních poruch (Bohuslavova et al., 2013). HIF-1 je nezbytný pro správné formování a migraci buněk neurální lišty a vznik komor srdce (Compernelle et al., 2003). Při studiu vlivu *Hif-1α*<sup>+/-</sup> se ukázalo, že tento genotyp vede k změně v exprese genu vaskulárního endotelialního růstového faktoru (*Vegfa*, z anglického: vascular endothelial growth factor A), který je klíčový transkripční faktor v srdci ovlivňující geny důležité pro vývoj srdce. Ke změně exprese genu *Vegfa* dochází i v diabetických srdcích.

#### **4.6.2 Změny v expresi genu *Pax3***

Mezi nejčastější vývojové vady diabetické embryopatie patří defekty neurální trubice. Frekvence výskytu defektů neurální trubice stoupá se zvyšující se hladinou glykémie (Fine et al., 1999). Hyperglykémie zvyšuje hladinu volný radikálu v buňce. Oxidativní stres inhibuje expresi *Pax3*. Exprese *Pax3* je ovlivněná hladinou volných radikálů v buňce, snížení hladiny volných radikálů k obnovení exprese *Pax3* (Chang et al., 2003). Gen *Pax3* je exprimován v buňkách neurální lišty, neuroepitelu a v somitech mezodermu. Mutace genu *Pax3* je u člověka spojená s Waardenburgovým syndromem. PAX3 ovlivňuje uzavření neurální trubice v oblasti středního a zadního mozku, dále ovlivňuje morfogenezi srdce, konkrétně septaci odtokové části komor (Kumar et al., 2007). PAX3 pravděpodobně nenarušuje migraci buněk neurální lišty, jak se dříve předpokládalo. Exprese PAX3 zabraňuje apoptóze buněk neurální lišty stimulací ubiquitinace a následnou degradací tumor supresoru P53 (Wang et al., 2011).

## 4.7 Epigenetika

Epigenetické modifikace tvoří spojnicí mezi okolním prostředím a genotypem jedince. Společně pak vytváří fenotyp jedince. Epigenetické modifikace závisí na věku, pohlaví a environmentálních faktorech. Ukázkou environmentálních faktorů může být nedostatečná výživa matky v průběhu těhotenství, například vlivem hladomoru. Vystavení matky hladomoru během těhotenství je spojeno s vývojem chronických onemocnění u potomka - například ischemické choroby srdeční a sníženou glukózovou intolerancí. (Painter et al., 2005; Ravelli et al., 1998; Roseboom et al., 2000). Změny v embryonálním programování se mohou uskutečnit i v případech, kdy nedošlo ke změně porodní váhy potomka (Roseboom et al., 2001). Účinky nitroděložního prostředí na plod závisí na jeho načasování expozice (Heijmans et al., 2008). Podvýživa matky během těhotenství může mít hluboký dopad na tělesné i duševní zdraví jedince například může vést k zvýšenému riziku schizofrenie (Susser et al., 1996). Stejně tak i diabetické těhotenství může negativně ovlivňovat psychiku a tělesné zdraví potomka během dospělosti.

Přesný mechanismus, který vede ke zvýšenému riziku chronických onemocnění v dospělosti zůstává nejasný. Důležitou roli by mohla hrát právě epigenetika, která citlivě reaguje na změny prostředí, což potvrzují některé studie na myším i lidském modelu. Epigenetické mechanismy zahrnuje několik mechanismů ovlivňujících expresi genů, podílejících se na inaktivaci X chromozomu, tkáňově specifické expresi genů a například na genovém imprintingu. Epigenetické mechanismy hrají důležitou roli v tzv. evolučně vývojové plasticitě, která zahrnuje přizpůsobení se životnímu prostředí během časného života. Negativní vliv maternálního diabetu na potomka může vést ke změnám v epigenomu. Změněný epigenom potomka vede k zvýšenému riziku onemocnění v průběhu života. Některé epigenetické modifikace mohou být dědičné. Výsledná exprese genů je výsledkem kombinací různých epigenetických modifikací (Espada et al., 2004).

### 4.7.1 DNA metylace

DNA metylace patří mezi hlavní epigenetické modifikace ovlivňující strukturu chromatinu. Methylace je obecně stabilní epigenetická modifikace nikoliv však ireverzibilní (Oswald et al., 2000). Změny mohou být dědičné, i když v zárodečných buňkách a v raném stádiu embrya dochází k reprogramování metylačních vzorců. Metylovány jsou nukleotidy

bohaté na cytosinu. Úseky bohaté na cytosiny, kde dochází k metylaci nejčastěji jsou označovány jako CpG ostrovy (Bird et al., 1985). CpG ostrovy jsou přítomné v oblasti promotoru mnoha genů, tím mohou ovlivňovat jejich expresi. Například metylace v promotoru pro inzulin potlačuje expresi inzulinu. Buňky produkující inzulin mají promotor demetylovaný (Kuroda et al., 2009). Přenos metylové skupiny na cytosin zajišťuje enzym DNA-metyltransferáza (DNMT) tvorbou 5-metyl-cytosinu. Většina DNMTáz metyluje hemimetylovanou DNA. Tento mechanismus udržuje specifický metylační vzor na DNA, tím je umožněn přenos specifických metylačních vzorců na dceřinné buňky. Specifické metylační vzorce vedou ke specifické genové expresi v různých tkáních (Battistuzzi et al., 1985). Metylace *de novo* zajišťují pouze určité typy DNMTáz a je častá při vývoji plodu (Jaenisch et al., 1982). *De novo* metylace je zajištěna pomocí DNA metyltransferáz DNMT 3A a DNMT 3B (Okano et al., 1999). V zárodečných buňkách dochází k reprogramování metylačních vzorců, což je důležité pro vytvoření širokého diferenciačního potenciálu. Metylace tak hraje důležitou roli při vývoji embrya (Li et al., 1992). Metylace DNA je důležitá při inaktivaci X chromozomu a genovém imprintingu a transpozonů. Struktura chromatinu ovlivňuje expresi genů. Metylace vede k umlčení genové exprese. Výživa bohatá na látky s metylovou skupinou ovlivňuje metylaci DNA matky a tyto modifikace jsou částečně dědičné a ovlivňují fenotyp potomků (Waterland and Jirtle, 2003; Wolff et al., 1998). Výživa může ovlivnit metylační vzorec také v zárodečných buňkách, tím může docházet k ovlivnění fenotypu potomka (Cropley et al., 2006). Perikoncepční expozice hladu vede ke snížení metylace v inzulinovém růstovém faktoru 2 (*IGF2*) (Heijmans et al., 2008), tato skutečnost vede k narušení imprintingu *IGF2*. Narušený imprinting genu *IGF2* je častým jevem u nádorů (Cui et al., 2003; Ravenel et al., 2001). Dalším důkazem potvrzující změny v epigenomu vlivem výživy matky jsou epigenetické změny v promotoru transkripčního faktoru hepatocytární jaderný faktor 4 $\alpha$  (*HNF-4 $\alpha$* , z anglického „hepatocyte nuclear factor 4 alpha“). Transkripční faktor *HNF-4 $\alpha$*  hraje roli při diferenciaci  $\beta$ - buněk pankreatu a může vést ke zvýšené incidenci DM2 (Love-Gregory et al., 2004). Strava s nízkým obsahem bílkovin vedla u myši ke snížení metylace CpG v promotoru P2, který je hlavním aktivním promotorem *HNF-4 $\alpha$*  v metylovaném stavu (Sandovici et al., 2011). Studie Wei a Loecken prokázala, že zvýšený oxidativní stres vlivem diabetu vede k zvýšené metylaci CpG genu *Pax3* prostřednictvím DNMT 3B (Wei and Loecken, 2014).

## 4.7.2 Modifikace histonů

Epigenetická modifikace histonů má zásadní vliv na strukturu chromatinu a genovou expresi. Modifikace histonů probíhá na jejich N-terminálních koncích.

### 4.7.2.1 Hyperacetylace histonů

Hyperacetylace histonů je spojena s transkripční aktivitou. Acetylace histonů neutralizuje kladný náboj histonů a tím dochází k uvolnění interakce histonů a DNA. Důležitou roli při acetylaci hraje acetylkoenzym A, který je substrátem pro acetylaci. Významnou roli zde hraje také adenosin trifosfát-citrát lyáza, enzym konvertující glukózu z citrátu na acetylkoenzym A. Charakteristickým rysem *diabetes mellitus* je zvýšená hladina glykémie, která vede k nadprodukci acetylkoenzym A. Nadbytek glukózy je spojen se zvýšenou acetylací histonů (Wellen et al., 2009).

Dle Pavlíkové et al.(2009) více než 30 % nalezených genů, které dereguluje *diabetes mellitus*, jsou identifikovány jako geny kódující transkripční faktory, proteiny účastníci se chromatinové modifikace a proteiny signální drah účastníci se transkripce (Pavlinkova et al., 2009). Do skupiny genů ovlivněných diabetem patří geny účastníci se chromatinové modifikace, mezi něž patří histon deacetylázy, acetyltransferázy, specifické demetylázy a metyltransferázy.

Nitroděložní růstová retardace plodu (IUGR z anglického: „intrauterine growth restriction“) v důsledku nedostatečnosti placenty vede k snížení exprese *Pdx-1* (z anglického: „pancreatic and duodenal homeobox“) (Park et al., 2008). PDX-1 je regulátorem růstu  $\beta$ -buněk pankreatu. Pro transkripci *Pdx-1* je důležitá acetylace H3 a H4 histonů na promotoru *Pdx-1*. Zárodky s IUGR vykazují pokles acetylace v H3 a H4 histonech, to je spojeno se ztrátou aktivátoru *Pdx-1* (USF-1), což vede k snížení transkripce *Pdx-1*(Qian et al., 1999). Snížení acetylace histonů je spojeno s metylací *de novo* v promotoru *Pdx-1*. Metylace DNA ve výsledku vede k rozvoji DM2.

### 4.7.2.2 Metylace histonů

Metylace histonů je zprostředkována histonovými metyltransferázami. To zda metylace histonů povede k rozbalení nebo spakování chromatinu závisí na pozici metylovaného zbytku. Vysoká hladina glykémie může zvyšovat aktivitu histon metyltrasferázy MLL5 (z anglického:

mixed lineage leukemia 5 gene) (Fujiki et al., 2009). Dochází k modifikaci H3K4 navázáním beta-N-acetylglukosaminu prostřednictvím O-GlcNAc (zkratka pro O-linked N-acetylglusamin) transferázy. Metylace histonu H3K4 mění chromatin do transkripčně aktivního stavu. V buňkách hladké svaloviny cév diabetické myši byla nalezena snížená metylace H3K9me3 (zkratka pro histon-3 lysin-9 tri-metylaci) (Villeneuve et al., 2008). H3K9me3 je represivní chromatinová značka. Snížením metylace dochází k zvýšení exprese genů, jejichž proteiny se podílejí na ateroskleróze v diabetickém prostředí. Další studie ukázala, že metylace histonů v lymfocytech může hrát roli v etiologii DM1 (Miao et al., 2008).

### 4.7.3 RNA interference

Nekódující RNA se nejčastěji podílejí na umlčení genu na post-transkripční úrovni. Nekódující RNA rozdělujeme na dvě třídy krátké a dlouhé RNA. Krátké RNA jsou získány štěpením dvouvláknové RNA, která může být endogenního i exogenního původu. Dlouhé nekódující RNA jsou větší než 200 nukleotidů. Mezi krátké RNA patří miRNA (micro-RNA, zkratka pro small non-coding RNA molecule), siRNA (short interfering RNA), piRNA (Piwi-interacting RNA). Krátké molekuly RNA zejména miRNA se podílejí na regulaci genů, proliferaci, diferenciaci a apoptóze buněk. Více než 20 % lidských genů je regulováno pomocí miRNA (Xie et al., 2005). Exprese miRNA je částečně specifická pro danou tkáň (Lagos-Quintana et al., 2002). Bylo prokázáno, že miRNA se podílí na regulaci produkce, sekrece a účinku inzulínu. Příkladem může být miRNA-375, která negativně ovlivňuje sekreci inzulínu v  $\beta$ -buňkách pankreatu. Zvýšená exprese miRNA-375 vede k snížení exprese myotriphinu, což je protein hrající roli v transportu inzulínu (Poy et al., 2004). miRNA hrají důležitou roli v patogenezi diabetu. Hyperglykémie indukuje zvýšenou expresi miRNA-221 v endoteliálních buňkách pupečnickové krve (Li et al., 2009). Zvýšená hladina miRNA-221 může modulovat angiogenezi přes c-kit receptor progenitorových buněk placenty (Poliseno et al., 2006). U diabetiků často dochází k progresi aterosklerózy. Příčinou je, že diabetes ovlivňuje expresi zánětlivých molekul (Shanmugam et al., 2003). Jeden z možných mechanismů ovlivnění exprese zánětlivých molekul je prostřednictvím miRNA (Villeneuve et al., 2010). Mezi časté komplikace diabetu patří srdeční onemocnění, které vede k srdečnímu selhání. Srdce diabetiků vykazuje hypertrofii (Nielsen et al., 1997). Jeden z možných mechanismů, který vede k hypertrofii kardiomyocytů může být exprese miRNA-133a (Feng et al., 2010).

## 5. Závěr:

Tento literární přehled shrnuje vliv diabetu na potomka. Poukazuje na význam vývoje jedince v děloze a jeho interakci s vnějšími vlivy jako je maternální diabetes mellitus. Tyto interakce mohou zvyšovat riziko chronických onemocnění v dospělosti a mohou vést k předčasnému úmrtí. Náchylnost k chronickým onemocněním je výsledkem změny v embryonálním programování vlivem diabetu. Kritickým bodem v embryonálním vývoji je první trimestr těhotenství, kdy dochází k vývoji orgánových soustav. Vliv diabetu v období organogeneze vede k vývojovým vadám, což potvrzuje teratogenní účinek diabetu. Diabetické prostředí má vliv na změny v transkriptomu a epigenomu jedince. Právě epigenetická regulace by mohla být významným hráčem v interakci diabetického prostředí a genomu potomka, připívající ke zvýšené náchylnosti k řadě onemocnění v dospělosti.

Změna v transkriptomu potomka byla popsána na zvířecím modelu diabetického těhotenství. Diabetes narušuje transkripční regulaci, příkladem je transkripční faktor HIF-1, který ovlivňuje další stovky genů, hrajících roli v hypoxii, glykolýze nebo angiogenezi. Zvýšená hladina glykémie vede k změnám v epigenomu jedince, zvýšením aktivity DNMT3b, miRNA-211 a metyltransferázy MLL5. Role epigenetických faktorů je popsána i u patogeneze diabetu, příkladem může být miRNA-133a vedoucí k hypertrofii srdce. Přestože jednotlivé studie ukazující na epigenetické změny vlivem diabetu, role epigenetických změn není stále objasněna u vlivu maternálního diabetu na potomka.

Nedostatky výzkumu vlivu diabetického těhotenství na potomka vidím v zanedbání role změn v zárodečných buňkách vlivem diabetes mellitus. Studie na spermiích ukazují, že paternální diabetes ovlivňuje metabolismus a genovou expresi potomků. Byly popsány změny v epigenomu spermií vlivem diabetu, které mohou být do značné míry dědičné. Tento výzkum dokazuje, že k ovlivnění potomka diabetem nedochází pouze v děloze matky. Budoucí výzkum bude zaměřen na funkční genomiku, na určení změn exprese genů a jejich produktů vlivem maternálního diabetu v rozsahu buněčného genomu, transkriptomu a epigenomu za využití „-omics“ metod.

## 6. Použitá literatura

Amer Diabet, A. (2000). Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 23, S77-S79.

Baker, L., Piddington, R., Goldman, A., Egler, J., and Moehring, J. (1990). Myo-inositol and prostaglandins reverse the glucose inhibition of neural tube fusion in cultured mouse embryos. *Diabetologia* 33, 593-596.

Battistuzzi, G., D'Urso, M., Toniolo, D., Persico, G.M., and Luzzatto, L. (1985). Tissue-specific levels of human glucose-6-phosphate dehydrogenase correlate with methylation of specific sites at the 3' end of the gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 1465-1469.

Becerra, J.E., Khoury, M.J., Cordero, J.F., and Erickson, J.D. (1990). Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study. *Pediatrics* 85, 1-9.

Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhatar, R., and Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes & development* 23, 781-783.

Berkowitz, G.S., Lapinski, R.H., Wein, R., and Lee, D. (1992). Race/ethnicity and other risk factors for gestational diabetes. *American journal of epidemiology* 135, 965-973.

Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O.J., and Macleod, D. (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40, 91-99.

Bohuslavova, R., Skvorova, L., Sedmera, D., Semenza, G.L., and Pavlinkova, G. (2013). Increased susceptibility of HIF-1alpha heterozygous-null mice to cardiovascular malformations associated with maternal diabetes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 60, 129-141.

Boney, C.M., Verma, A., Tucker, R., and Vohr, B.R. (2005). Metabolic syndrome in childhood: Association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 115, E290-E296.

Brons, C., Jensen, C.B., Storgaard, H., Alibegovic, A., Jacobsen, S., Nilsson, E., Astrup, A., Quistorff, B., and Vaag, A. (2008). Mitochondrial function in skeletal muscle is normal and unrelated to insulin action in young men born with low birth weight. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 3885-3892.

Casson, I.F., Clarke, C.A., Howard, C.V., McKendrick, O., Pennycook, S., Pharoah, P.O.D., Platt, M.J., Stanisstree, M., vanVelszen, D., and Walkinshaw, S. (1997). Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. *British Medical Journal* 315, 275-278.

Cederberg, J., Siman, C.M., and Eriksson, U.J. (2001). Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatric research* 49, 755-762.

Clausen, T.D., Mathiesen, E.R., Hansen, T., Pedersen, O., Jensen, D.M., Lauenborg, J., Schmidt, L., and Damm, P. (2009). Overweight and the Metabolic Syndrome in Adult Offspring of Women with Diet-Treated Gestational Diabetes Mellitus or Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 2464-2470.

Compernelle, V., Brusselmans, K., Franco, D., Moorman, A., Dewerchin, M., Collen, D., and Carmeliet, P. (2003). Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Cardiovascular research* 60, 569-579.

Correa, A., Gilboa, S.M., Besser, L.M., Botto, L.D., Moore, C.A., Hobbs, C.A., Cleves, M.A., Riehle-Colarusso, T.J., Waller, D.K., and Reece, E.A. (2008). Diabetes mellitus and birth defects. *American journal of obstetrics and gynecology* 199, 237 e231-239.

Correa, A., Gilboa, S.M., Botto, L.D., Moore, C.A., Hobbs, C.A., Cleves, M.A., Riehle-Colarusso, T.J., Waller, D.K., Reece, E.A., and National Birth Defects Prevention, S. (2012). Lack of periconceptional vitamins or supplements that contain folic acid and diabetes mellitus-associated birth defects. *American journal of obstetrics and gynecology* 206, 218 e211-213.

Cropley, J.E., Suter, C.M., Beckman, K.B., and Martin, D.I. (2006). Germ-line epigenetic modification of the murine A vy allele by nutritional supplementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17308-17312.

Cui, H., Cruz-Correa, M., Giardiello, F.M., Hutcheon, D.F., Kafonek, D.R., Brandenburg, S., Wu, Y., He, X., Powe, N.R., and Feinberg, A.P. (2003). Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 299, 1753-1755.

Czeizel, A.E., and Dudas, I. (1992). Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *The New England journal of medicine* 327, 1832-1835.

Danielsen, I., Granstrom, C., Haldorsson, T., Rytter, D., Bech, B.H., Henriksen, T.B., Vaag, A.A., and Olsen, S.F. (2013). Dietary Glycemic Index during Pregnancy Is Associated with Biomarkers of the Metabolic Syndrome in Offspring at Age 20 Years. *PLoS One* 8, 8.

Daskalakis, G., Marinopoulos, S., Krielesi, V., Papapanagiotou, A., Papantoniou, N., Mesogitis, S., and Antsaklis, A. (2008). Placental pathology in women with gestational diabetes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 87, 403-407.

DeFronzo, R.A. (2009). From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes* 58, 773-795.

Dunne, F., Brydon, P., Smith, K., and Gee, H. (2003). Pregnancy in women with Type 2 diabetes: 12 years outcome data 1990-2002. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 20, 734-738.

Espada, J., Ballestar, E., Fraga, M.F., Villar-Garea, A., Juarranz, A., Stockert, J.C., Robertson, K.D., Fuks, F., and Esteller, M. (2004). Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern. *The Journal of biological chemistry* 279, 37175-37184.

Feng, B., Chen, S., George, B., Feng, Q., and Chakrabarti, S. (2010). miR133a regulates cardiomyocyte hypertrophy in diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews* 26, 40-49.

Fine, E.L., Horal, M., Chang, T.I., Fortin, G., and Loeken, M.R. (1999). Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes* 48, 2454-2462.

- Fischer, B., and Bavister, B.D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of reproduction and fertility* 99, 673-679.
- Freathy, R.M., Bennett, A.J., Ring, S.M., Shields, B., Groves, C.J., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Lindgren, C.M., Lango, H., *et al.* (2009). Type 2 Diabetes Risk Alleles Are Associated With Reduced Size at Birth. *Diabetes* 58, 1428-1433.
- Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R.G., Kitagawa, H., and Kato, S. (2009). GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature* 459, 455-459.
- Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J.W., and Fisher, S.J. (1997). Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277, 1669-1672.
- Greene, M.F. (1999). Spontaneous abortions and major malformations in women with diabetes mellitus. *Seminars in reproductive endocrinology* 17, 127-136.
- Greene, M.F., Hare, J.W., Cloherty, J.P., Benacerraf, B.R., and Soeldner, J.S. (1989). First-trimester hemoglobin A1 and risk for major malformation and spontaneous abortion in diabetic pregnancy. *Teratology* 39, 225-231.
- Grunnet, L., Vielwerth, S., Vaag, A., and Poulsen, P. (2007). Birth weight is nongenetically associated with glucose intolerance in elderly twins, independent of adult obesity. *J Intern Med* 262, 96-103.
- Hales, C.N., Barker, D.J.P., Clark, P.M.S., Cox, L.J., Fall, C., Osmond, C., and Winter, P.D. (1991). FETAL AND INFANT GROWTH AND IMPAIRED GLUCOSE-TOLERANCE AT AGE 64. *British Medical Journal* 303, 1019-1022.
- Harding, J.E. (2001). The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *International Journal of Epidemiology* 30, 15-23.
- Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Stein, A.D., Putter, H., Blauw, G.J., Susser, E.S., Slagboom, P.E., and Lumey, L.H. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17046-17049.
- Chang, T.I., Horal, M., Jain, S.K., Wang, F., Patel, R., and Loeken, M.R. (2003). Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia* 46, 538-545.
- Chew, E.Y., Mills, J.L., Metzger, B.E., Remaley, N.A., Jovanovic-Peterson, L., Knopp, R.H., Conley, M., Rand, L., Simpson, J.L., Holmes, L.B., *et al.* (1995). Metabolic control and progression of retinopathy. The Diabetes in Early Pregnancy Study. National Institute of Child Health and Human Development Diabetes in Early Pregnancy Study. *Diabetes Care* 18, 631-637.
- Chu, S.Y., Callaghan, W.M., Kim, S.Y., Schmid, C.H., Lau, J., England, L.J., and Dietz, P.M. (2007). Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 30, 2070-2076.
- Irfan, S., Arain, T.M., Shaukat, A., and Shahid, A. (2004). Effect of pregnancy on diabetic nephropathy and retinopathy. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP* 14, 75-78.

- Jacob, R.A., Gretz, D.M., Taylor, P.C., James, S.J., Pogribny, I.P., Miller, B.J., Henning, S.M., and Swendseid, M.E. (1998). Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *The Journal of nutrition* *128*, 1204-1212.
- Jaenisch, R., Harbers, K., Jahner, D., Stewart, C., and Stuhlmann, H. (1982). DNA methylation, retroviruses, and embryogenesis. *Journal of cellular biochemistry* *20*, 331-336.
- Joss-Moore, L.A., and Lane, R.H. (2009). The developmental origins of adult disease. *Curr Opin Pediatr* *21*, 230-234.
- Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., and Renold, A.E. (1969). Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *The Journal of clinical investigation* *48*, 2129-2139.
- Kappen, C., and Salbaum, J.M. (2014). Gene expression in teratogenic exposures: a new approach to understanding individual risk. *Reproductive toxicology* *45*, 94-104.
- Kitzmiller, J.L., Gavin, L.A., Gin, G.D., Jovanovic-Peterson, L., Main, E.K., and Zigrang, W.D. (1991). Preconception care of diabetes. Glycemic control prevents congenital anomalies. *Jama* *265*, 731-736.
- Kolm-Litty, V., Sauer, U., Nerlich, A., Lehmann, R., and Schleicher, E.D. (1998). High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *The Journal of clinical investigation* *101*, 160-169.
- Kumar, S.D., Dheen, S.T., and Tay, S.S.W. (2007). Maternal diabetes induces congenital heart defects in mice by altering the expression of genes involved in cardiovascular development. *Cardiovasc Diabetol* *6*, 14.
- Kuroda, A., Rauch, T.A., Todorov, I., Ku, H.T., Al-Abdullah, I.H., Kandeel, F., Mullen, Y., Pfeifer, G.P., and Ferreri, K. (2009). Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS One* *4*, e6953.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB* *12*, 735-739.
- Landon, M.B., Mele, L., Spong, C.Y., Carpenter, M.W., Ramin, S.M., Casey, B., Wapner, R.J., Varner, M.W., Rouse, D.J., Thorp, J.M., *et al.* (2011). The Relationship Between Maternal Glycemia and Perinatal Outcome. *Obstet Gynecol* *117*, 218-224.
- Lauszus, F.F., Klebe, J.G., and Flyvbjerg, A. (2001). Macrosomia associated with maternal serum insulin-like growth factor-I and -II in diabetic pregnancy. *Obstet Gynecol* *97*, 734-741.
- Lee, A.Y.W., Chung, S.K., and Chung, S.S.M. (1995). DEMONSTRATION THAT POLYOL ACCUMULATION IS RESPONSIBLE FOR DIABETIC CATARACT BY THE USE OF TRANSGENIC MICE EXPRESSING THE ALDOSE REDUCTASE GENE IN THE LENS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 2780-2784.
- Leiter, E.H. (1989). The genetics of diabetes susceptibility in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *3*, 2231-2241.

- Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926.
- Li, R., Chase, M., Jung, S.K., Smith, P.J., and Loeken, M.R. (2005). Hypoxic stress in diabetic pregnancy contributes to impaired embryo gene expression and defective development by inducing oxidative stress. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 289, E591-599.
- Li, Y., Song, Y.H., Li, F., Yang, T., Lu, Y.W., and Geng, Y.J. (2009). MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction. *Biochemical and biophysical research communications* 381, 81-83.
- Li, Y.P., He, Y.N., Qi, L., Jaddoe, V.W., Feskens, E.J.M., Yang, X.G., Ma, G.S., and Hu, F.B. (2010). Exposure to the Chinese Famine in Early Life and the Risk of Hyperglycemia and Type 2 Diabetes in Adulthood. *Diabetes* 59, 2400-2406.
- Lindsay, R.S., Dabelea, D., Roumain, J., Hanson, R.L., Bennett, P.H., and Knowler, W.C. (2000). Type 2 diabetes and low birth weight: the role of paternal inheritance in the association of low birth weight and diabetes. *Diabetes* 49, 445-449.
- Lobner, K., Knopff, A., Baumgarten, A., Mollenhauer, U., Marienfeld, S., Garrido-Franco, M., Bonifacio, E., and Ziegler, A.G. (2006). Predictors of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 55, 792-797.
- Loffredo, C.A., Wilson, P.D., and Ferencz, C. (2001). Maternal diabetes: an independent risk factor for major cardiovascular malformations with increased mortality of affected infants. *Teratology* 64, 98-106.
- Love-Gregory, L.D., Wasson, J., Ma, J., Jin, C.H., Glaser, B., Suarez, B.K., and Permutt, M.A. (2004). A common polymorphism in the upstream promoter region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes and appears to contribute to the evidence for linkage in an ashkenazi jewish population. *Diabetes* 53, 1134-1140.
- Lu, M., Kuroki, M., Amano, S., Tolentino, M., Keough, K., Kim, I., Bucala, R., and Adamis, A.P. (1998). Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *The Journal of clinical investigation* 101, 1219-1224.
- Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation symposium* 156, 38-50; discussion 50-35.
- Martins, J.d.O., Panício, M.I., Dantas, M.P.S., and Gomes, G.N. (2014). Effect of maternal diabetes on female offspring. *Einstein (São Paulo)* 12, 413-419.
- McCarthy, M.I. (2010). GENOMIC MEDICINE Genomics, Type 2 Diabetes, and Obesity. *N Engl J Med* 363, 2339-2350.
- McIntire, D.D., Bloom, S.L., Casey, B.M., and Leveno, K.J. (1999). Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *N Engl J Med* 340, 1234-1238.
- Metzger, B.E., Lowe, L.P., Dyer, A.R., Trimble, E.R., Chaovarindr, U., Coustan, D.R., Hadden, D.R., McCance, D.R., Hod, M., McIntyre, H.D., *et al.* (2008). Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 358, 1991-2002.

- Miao, F., Smith, D.D., Zhang, L., Min, A., Feng, W., and Natarajan, R. (2008). Lymphocytes from patients with type 1 diabetes display a distinct profile of chromatin histone H3 lysine 9 dimethylation: an epigenetic study in diabetes. *Diabetes* 57, 3189-3198.
- Miller, E., Hare, J.W., Cloherty, J.P., Dunn, P.J., Gleason, R.E., Soeldner, J.S., and Kitzmiller, J.L. (1981). Elevated Maternal Hemoglobin A1C in Early Pregnancy and Major Congenital Anomalies in Infants of Diabetic Mothers. *N Engl J Med* 304, 1331-1334.
- Mills, J.L., Baker, L., and Goldman, A.S. (1979). Malformations in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week. Implications for treatment. *Diabetes* 28, 292-293.
- Mironiuk, M., Kietlinska, Z., Jezierska-Kasprzyk, K., and Piekosz-Orzechowska, B. (1997). A class of diabetes in mother, glycemic control in early pregnancy and occurrence of congenital malformations in newborn infants. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology* 24, 193-197.
- Monrad, R.N., Grunnet, L.G., Rasmussen, E.L., Malis, C., Vaag, A., and Poulsen, P. (2009). Age-Dependent Nongenetic Influences of Birth Weight and Adult Body Fat on Insulin Sensitivity in Twins. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 2394-2399.
- Moriwaki, M., Itoh, N., Miyagawa, J., Yamamoto, K., Imagawa, A., Yamagata, K., Iwahashi, H., Nakajima, H., Namba, M., Nagata, S., *et al.* (1999). Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 42, 1332-1340.
- MRC (1991). Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet* 338, 131-137.
- Nielsen, F.S., Ali, S., Rossing, P., Bang, L.E., Svendsen, T.L., Gall, M.A., Smidt, U.M., Kastrup, J., and Parving, H.H. (1997). Left ventricular hypertrophy in non-insulin-dependent diabetic patients with and without diabetic nephropathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 14, 538-546.
- Nielsen, G.L., Norgard, B., Puho, E., Rothman, K.J., Sorensen, H.T., and Czeizel, A.E. (2005). Risk of specific congenital abnormalities in offspring of women with diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 22, 693-696.
- Nomura, Y., Marks, D.J., Grossman, B., Yoon, M., Loudon, H., Stone, J., and Halperin, J.M. (2012). Exposure to gestational diabetes mellitus and low socioeconomic status: effects on neurocognitive development and risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in offspring. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 166, 337-343.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257.
- Ornoy, A., Ratzon, N., Greenbaum, C., Peretz, E., Soriano, D., and Dulitzky, M. (1998). Neurobehaviour of school age children born to diabetic mothers. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition* 79, F94-99.

Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., and Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current biology : CB* *10*, 475-478.

Painter, R.C., Roseboom, T.J., and Bleker, O.P. (2005). Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reproductive toxicology* *20*, 345-352.

Park, J.H., Stoffers, D.A., Nicholls, R.D., and Simmons, R.A. (2008). Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *The Journal of clinical investigation* *118*, 2316-2324.

Patterson, Gisela G Dahlquist, Eva Gyürüs, Anders Green, Soltész, G., and Group, a.t.E.S. (2000). Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet* *355*, 873-876.

Pavlinkova, G., Salbaum, J.M., and Kappen, C. (2009). Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo. *BMC genomics* *10*, 274.

Pociot, F., Akolkar, B., Concannon, P., Erlich, H.A., Julier, C., Morahan, G., Nierras, C.R., Todd, J.A., Rich, S.S., and Nerup, J. (2010). Genetics of Type 1 Diabetes: What's Next? *Diabetes* *59*, 1561-1571.

Poliseno, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Citti, L., Woods, K., Mercatanti, A., Hammond, S., and Rainaldi, G. (2006). MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* *108*, 3068-3071.

Poulsen, P., Kyvik, K.O., Vaag, A., and Beck-Nielsen, H. (1999). Heritability of Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance - a population-based twin study. *Diabetologia* *42*, 139-145.

Poy, M.N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P.E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., *et al.* (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* *432*, 226-230.

Qian, J., Kaytor, E.N., Towle, H.C., and Olson, L.K. (1999). Upstream stimulatory factor regulates Pdx-1 gene expression in differentiated pancreatic beta-cells. *The Biochemical journal* *341 ( Pt 2)*, 315-322.

Radaelli, T., Varastehpour, A., Catalano, P., and Hauguel-de Mouzon, S. (2003). Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes* *52*, 2951-2958.

Ravelli, A.C., van der Meulen, J.H., Michels, R.P., Osmond, C., Barker, D.J., Hales, C.N., and Bleker, O.P. (1998). Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* *351*, 173-177.

Ravelli, G.P., Stein, Z.A., and Susser, M.W. (1976). OBESITY IN YOUNG MEN AFTER FAMINE EXPOSURE IN UTERO AND EARLY INFANCY. *N Engl J Med* *295*, 349-353.

Ravenel, J.D., Broman, K.W., Perlman, E.J., Niemitz, E.L., Jayawardena, T.M., Bell, D.W., Haber, D.A., Uejima, H., and Feinberg, A.P. (2001). Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II (IGF2) gene in distinguishing specific biologic subtypes of Wilms tumor. *Journal of the National Cancer Institute* *93*, 1698-1703.

- Ray, J.G., Vermeulen, M.J., Shapiro, J.L., and Kenshole, A.B. (2001). Maternal and neonatal outcomes in pregestational and gestational diabetes mellitus, and the influence of maternal obesity and weight gain: the DEPOSIT\* study. *QJM-Mon J Assoc Physicians* 94, 347-356.
- Reece, E.A., Homko, C.J., and Wu, Y.K. (1996). Multifactorial basis of the syndrome of diabetic embryopathy. *Teratology* 54, 171-182.
- Reece, E.A., Homko, C.J., Wu, Y.K., and Wiznitzer, A. (1998). The role of free radicals and membrane lipids in diabetes-induced congenital malformations. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 5, 178-187.
- Rodesch, F., Simon, P., Donner, C., and Jauniaux, E. (1992). Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 80, 283-285.
- Rogvi, R.A., Forman, J.L., Damm, P., and Greisen, G. (2012). Women Born Preterm or with Inappropriate Weight for Gestational Age Are at Risk of Subsequent Gestational Diabetes and Pre-Eclampsia. *PLoS One* 7, 7.
- Roseboom, T.J., van der Meulen, J.H., Osmond, C., Barker, D.J., Ravelli, A.C., Schroeder-Tanka, J.M., van Montfrans, G.A., Michels, R.P., and Bleker, O.P. (2000). Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45. *Heart* 84, 595-598.
- Roseboom, T.J., van der Meulen, J.H., Ravelli, A.C., Osmond, C., Barker, D.J., and Bleker, O.P. (2001). Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Molecular and cellular endocrinology* 185, 93-98.
- Rossing, K., Jacobsen, P., Hommel, E., Mathiesen, E., Svenningsen, A., Rossing, P., and Parving, H.H. (2002). Pregnancy and progression of diabetic nephropathy. *Diabetologia* 45, 36-41.
- Sandovici, I., Smith, N.H., Nitert, M.D., Ackers-Johnson, M., Uribe-Lewis, S., Ito, Y., Jones, R.H., Marquez, V.E., Cairns, W., Tadayyon, M., *et al.* (2011). Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5449-5454.
- Shand, A.W., Bell, J.C., McElduff, A., Morris, J., and Roberts, C.L. (2008). Outcomes of pregnancies in women with pre-gestational diabetes mellitus and gestational diabetes mellitus; a population-based study in New South Wales, Australia, 1998-2002. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 25, 708-715.
- Shanmugam, N., Reddy, M.A., Guha, M., and Natarajan, R. (2003). High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* 52, 1256-1264.
- Sharma, M.K., and Buettner, G.R. (1993). Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: an ESR study. *Free radical biology & medicine* 14, 649-653.
- Sharpe, P.B., Chan, A., Haan, E.A., and Hiller, J.E. (2005). Maternal diabetes and congenital anomalies in South Australia 1986-2000: a population-based cohort study. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 73, 605-611.

- Sheffield, J.S., Butler-Koster, E.L., Casey, B.M., McIntire, D.D., and Leveno, K.J. (2002). Maternal diabetes mellitus and infant malformations. *Obstet Gynecol* 100, 925-930.
- Schaefer-Graf, U.M., Buchanan, T.A., Xiang, A., Songster, G., Montoro, M., and Kjos, S.L. (2000). Patterns of congenital anomalies and relationship to initial maternal fasting glucose levels in pregnancies complicated by type 2 and gestational diabetes. *American journal of obstetrics and gynecology* 182, 313-320.
- Schneider, S., Bock, C., Wetzell, M., Maul, H., and Loerbroks, A. (2012). The prevalence of gestational diabetes in advanced economies. *J Perinat Med* 40, 511-520.
- Schwartz, R., Gruppuso, P.A., Petzold, K., Brambilla, D., Hiilesmaa, V., and Teramo, K.A. (1994). Hyperinsulinemia and macrosomia in the fetus of the diabetic mother. *Diabetes Care* 17, 640-648.
- Silverman, B.L., Metzger, B.E., Cho, N.H., and Loeb, C.A. (1995). Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers. Relationship to fetal hyperinsulinism. *Diabetes Care* 18, 611-617.
- Simmons, R.A., Templeton, L.J., and Gertz, S.J. (2001). Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 50, 2279-2286.
- Sobngwi, E., Boudou, P., Mauvais-Jarvis, F., Leblanc, H., Velho, G., Vexiau, P., Porcher, R., Hadjadj, S., Pratley, R., Tataranni, P.A., *et al.* (2003). Effect of a diabetic environment in utero on predisposition to type 2 diabetes. *Lancet* 361, 1861-1865.
- Solomon, C.G., Willett, W.C., Carey, V.J., Rich-Edwards, J., Hunter, D.J., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Speizer, F.E., Spiegelman, D., and Manson, J.E. (1997). A prospective study of pregravid determinants of gestational diabetes mellitus. *Jama* 278, 1078-1083.
- Stanner, S.A., Bulmer, K., Andres, C., Lantseva, O.E., Borodina, V., Poteen, V.V., and Yudkin, J.S. (1997). Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *British Medical Journal* 315, 1342-1348.
- Susser, E., Neugebauer, R., Hoek, H.W., Brown, A.S., Lin, S., Labovitz, D., and Gorman, J.M. (1996). Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Archives of general psychiatry* 53, 25-31.
- Todorova, K., Mazneikova, V., Ivanov, S., and Genova, M. (2005). [The frequency of mild and severe fetal malformations in diabetic women with high values of glycosilated hemoglobin in early pregnancy]. *Akusherstvo i ginekologija* 44, 3-10.
- Turner, R., Stratton, I., Horton, V., Manley, S., Zimmet, P., Mackay, I.R., Shattock, M., Bottazzo, G.F., and Holman, R. (1997). UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet* 350, 1288-1293.
- Ullmo, S., Vial, Y., Di Bernardo, S., Roth-Kleiner, M., Mivelaz, Y., Sekarski, N., Ruiz, J., and Meijboom, E.J. (2007). Pathologic ventricular hypertrophy in the offspring of diabetic mothers: a retrospective study. *European heart journal* 28, 1319-1325.

Villeneuve, L.M., Kato, M., Reddy, M.A., Wang, M., Lanting, L., and Natarajan, R. (2010). Enhanced levels of microRNA-125b in vascular smooth muscle cells of diabetic db/db mice lead to increased inflammatory gene expression by targeting the histone methyltransferase Suv39h1. *Diabetes* 59, 2904-2915.

Villeneuve, L.M., Reddy, M.A., Lanting, L.L., Wang, M., Meng, L., and Natarajan, R. (2008). Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9047-9052.

Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 4304-4308.

Wang, X.D., Morgan, S.C., and Loeken, M.R. (2011). Pax3 stimulates p53 ubiquitination and degradation independent of transcription. *PLoS One* 6, e29379.

Waterland, R.A., and Jirtle, R.L. (2003). Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Molecular and cellular biology* 23, 5293-5300.

Wei, D., and Loeken, M.R. (2014). Increased DNA methyltransferase 3b (Dnmt3b)-mediated CpG island methylation stimulated by oxidative stress inhibits expression of a gene required for neural tube and neural crest development in diabetic pregnancy. *Diabetes* 63, 3512-3522.

Weitzman, S.A., Turk, P.W., Milkowski, D.H., and Kozlowski, K. (1994). Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 1261-1264.

Wellen, K.E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U.M., Bui, T.V., Cross, J.R., and Thompson, C.B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* 324, 1076-1080.

Wentzel, P., Gareskog, M., and Eriksson, U.J. (2005). Folic acid supplementation diminishes diabetes- and glucose-induced dysmorphogenesis in rat embryos in vivo and in vitro. *Diabetes* 54, 546-553.

Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C., and Shaw, J. (2011). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 94, 311-321.

WHO, W.H.O. (1999). *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications*

WHO, W.H.O. (2014). *WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2012* (Geneva).

Williams, B., Gallacher, B., Patel, H., and Orme, C. (1997). Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* 46, 1497-1503.

Wiznitzer, A., Ayalon, N., Hershkovitz, R., Khamaisi, M., Reece, E.A., Trischler, H., and Bashan, N. (1999). Lipoic acid prevention of neural tube defects in offspring of rats with streptozocin-induced diabetes. *American journal of obstetrics and gynecology* 180, 188-193.

Wolff, G.L., Kodell, R.L., Moore, S.R., and Cooney, C.A. (1998). Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12, 949-957.

Wren, C., Birrell, G., and Hawthorne, G. (2003). Cardiovascular malformations in infants of diabetic mothers. *Heart* 89, 1217-1220.

Wu, C.S., Nohr, E.A., Bech, B.H., Vestergaard, M., and Olsen, J. (2012). Long-Term Health Outcomes in Children Born to Mothers with Diabetes: A Population-Based Cohort Study. *PLoS One* 7, 7.

Xia, P., Inoguchi, T., Kern, T.S., Engerman, R.L., Oates, P.J., and King, G.L. (1994). Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* 43, 1122-1129.

Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E.J., Golub, T.R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., and Kellis, M. (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434, 338-345.

Yang, P., Zhao, Z., and Reece, E.A. (2008). Activation of oxidative stress signaling that is implicated in apoptosis with a mouse model of diabetic embryopathy. *American journal of obstetrics and gynecology* 198, 130 e131-137.