

14. SOUHRN A ZÁVĚR

Stanovené cíle dizertační práce byly splněny:

Byl sestaven soubor 12 rodin s neurčeným typem MODY a rozsáhlé soubory diabetiků 2. typu, potomků diabetiků 2. typu nepříbuzných s našimi DM2 pacienty, gestačních diabetiček a kontrolních jedinců, které byly podrobně biochemicky a antropometricky charakterizovány. Pro potřeby vyhodnocování a statistické analýzy byla vytvořena databáze získaných dat.

Byla vytvořena DNA banka, která slouží ke studování polymorfismů a mutací v kandidátních genech.

Pro všechny studované genetické lokusy byla zavedena metoda PCR.

Metoda RFLP byla zavedena pro detekci polymorfismů -30G>A v B-promotoru *GCK* genu a A98V v *HNF-1 α* genu.

Metoda SSCP byla vzhledem k menší finanční náročnosti než RFLP analýza následně použita pro detekci polymorfismu -30G>A v B-promotoru *GCK* genu

TGGE analýza byla zavedena pro exony 1a–7 *GCK* genu. Pro exony 8–10 se nám nepodařilo najít vhodné primery s GC-clampem, které jsou nezbytné pro použití TGGE metody.

Pro identifikaci genových variant všech exonů specifických pro β -buňky (1a–10) *GCK* genu byla zavedena metoda SSCP analýzy.

Vzorky, které byly během TGGE a/nebo SSCP analýzy *GCK* genu shledány jako pozitivní, byly následně obousměrně sekvenovány.

Potvrdili jsme vysokou senzitivitu obou screeningových metod – shoda v detekci pozitivních nálezů mezi analýzami TGGE a SSCP dosáhla 100 %.

V souboru MODY rodin jsme ve dvou různých rodinách našli v exonu 2 *GCK* genu jednu dosud nepopsanou mutaci V33A a dříve popsanou mutaci v populaci českých MODY pacientů E40K. V další MODY rodině byla

identifikována dosud nedetekovaná intronová varianta IVS4+87C>A, u jednoho člena rodiny dokonce v homozygotním stavu. Zastoupení MODY2 ve vzorku naší MODY populace činilo 16,7 %, což je zhruba polovina záchytu dříve zveřejněných výsledků populačního screeningu MODY v české populaci.

Přestože jsme našli u jedné gestační diabetičky novou intronovou mutaci IVS2+1G>A, u jednoho pacienta s DM2 dříve popsáný polymorfismus Ser263Ser v exonu 7, v populaci diabetiků i nediabetiků dříve uváděný polymorfismus Tyr215Tyr v exonu 6 a také řadu intronových variant v *GCK* genu, neprokázali jsme zvýšený záchyt mutací a polymorfismů v tomto genu v české diabetické populaci oproti populaci nediabetické.

Nezjistili jsme statisticky významný rozdíl v genotypových frekvencích polymorfismu -30G>A v B-promotoru *GCK* genu mezi soubory diabetických a nediabetických jedinců. Nicméně, v kontrolní populaci jsem potvrdili vliv minoritní alely A v homozygotním stavu na zvýšení hladin lačné i stimulovaných hodnot glykemie a na zvýšení inzulinové rezistence. Vliv tohoto polymorfismu vykazoval efekt dávky, homozygotní jedinci GA měli hodnoty sledovaných antropometrických i biochemických parametrů srovnatelné s majoritními homozygoty GG. U ostatních studovaných souborů nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl ve sledovaných parametrech v závislosti na genotypu.

Frekvenční zastoupení minoritní alely T polymorfismu A98V v genu pro *HNF-1 α* nebylo vyšší v české diabetické populaci v porovnání s populací nediabetiků. Neprokázali jsme vliv tohoto polymorfismu na zhoršenou inzulinovou sekreci, jak bylo uváděno v odborné literatuře. Naopak jsme v kontrolním souboru zjistili zvýšenou sekreci inzulinu během druhé fáze OGTT a lepší funkci β -buněk u heterozygotních jedinců oproti běžným homozygotům. U ostatních studovaných souborů nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl ve sledovaných parametrech v závislosti na genotypu.

Z naší studie vyplývá, že mutace a polymorfismy genu pro *GCK* stejně jako polymorfismus -30G>A v B-promotoru *GCK* genu a polymorfismus A98V v genu pro *HNF-1 α* se v patogenezi diabetu 2. typu a gestačního diabetu u české populace neuplatňují, nebo pouze okrajově v interakci s dalšími genetickými a vnějšími faktory. Studium těchto interakcí gen–gen a gen–prostředí si zaslouží velkou pozornost a je předmětem našeho dalšího výzkumu.