

Karlova Univerzita v Praze

1. lékařská fakulta

**Gynekologicko-porodnická klinika 1.LF UK a VFN
III. interní klinika 1.LF UK a VFN
Ústav biochemie a experimentální onkologie 1.LF UK**

ÚLOHA TUKOVÉ TKÁNĚ V REGULACI INZULÍNOVÉ SENZITIVITY BĚHEM TĚHOTENSTVÍ

Dizertační práce

Postgraduální doktorské studium biomedicíny

Oborová rada: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

MUDR. PETRA KLEIBLOVÁ

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Calda, CSc.

Gynekologicko-porodnická klinika 1.LF UK a VFN

Školitel konzultant: Doc. MUDr. Martin Haluzík, CSc.

III. interní klinika 1. LF UK a VFN

2007

Práce byla podpořena grantem IGA MZČR 8302-5 a Výzkumným záměrem MSM 0021620814

Obsah

1	TEORETICKÝ ÚVOD	5
1.1	INZULÍNOVÁ SENZITIVITA , INZULÍNOVÁ REZISTENCE A GESTAČNÍ DIABETES MELLITUS	6
1.1.1	Inzulínová senzitivita, rezistence	6
1.1.2	Inzulín	7
1.1.2.1	Syntéza a uvolňování inzulínu	7
1.1.2.2	Inzulínová signalizace v buňkách periferních tkání	9
1.1.2.3	Degradace inzulínu	11
1.1.3	Molekulární podstata vzniku inzulínové rezistence a DM	12
1.1.4	Inzulínová rezistence v těhotenství a gestační diabetes mellitus	13
1.1.4.1	Placenta jako endokrinní orgán	14
1.1.4.2	Zvýšená inzulínová rezistence u těhotných	16
1.1.4.3	Gestační diabetes mellitus	16
1.2	TUKOVÁ TKÁŇ A JEJÍ ÚLOHA V REGULACI ENERGETICKÉHO METABOLIZMU A INZULÍNOVÉ SENZITIVITY	19
1.3	CHARAKTERISTIKA ZÁKLADNÍCH ADIPOKINŮ	21
1.3.1	Adiponectin	21
1.3.1.1	Struktura a uspořádání adiponectinu	21
1.3.1.2	Adiponectinové receptory	24
1.3.1.3	Účinky adiponectinu, zejména ve vztahu k inzulínové senzitivitě	25
1.3.1.4	Změny sérových koncentrací adiponectinu	25
1.3.1.5	Ovlivnění exprese adiponectinu	26
1.3.2	Leptin	27
1.3.2.1	Struktura a uspořádání leptinu	27
1.3.2.2	Leptinový receptor	28
1.3.2.3	Účinky leptinu	28
1.3.2.4	Ovlivnění exprese leptinu a jeho sérových koncentrací	29
1.3.3	Resistin	30
1.3.3.1	Struktura a uspořádání resistinu	30
1.3.3.2	Účinky resistinu	31
1.3.3.3	Ovlivnění exprese a sérových koncentrací resistinu	31
1.3.4	Tumor necrosis factor α (TNF α)	32

1.3.4.1	Struktura TNF α a jeho receptory	32
1.3.4.2	Vliv TNF α na rozvoj inzulínové rezistence a na metabolismus adipocytů	34
1.3.5	Další adipokiny	35
1.4	ZMĚNY ADIPOKINŮ V TĚHOTENSTVÍ A PŘI GESTAČNÍM DIABETU MELLITU	36
2	CÍL PRÁCE	38
3	METODY	39
3.1	STRATEGIE ŘEŠENÍ	39
3.2	CHARAKTERIZACE SÉROVÝCH KONCENTRACÍ ADIPOSECTINU V ZÁVISLOSTI NA MENSTRUACNÍM CYKLU	40
3.2.1	Vlastnosti vyšetřovaného souboru	40
3.2.2	Odběr a zpracování vzorků periferní žilní krve	40
3.2.3	Stanovení adiponektinu, hormonů charakterizujících menstruační cyklus a biochemických markerů diabetu mellitu	40
3.2.4	Statistické zpracování výsledků	41
3.3	CHARAKTERIZACE EXPRESNÍHO PROFILU TUKOVÉ TKÁNĚ A PLACENTY VE VZTAHU KE GDM	41
3.3.1	Vlastnosti vyšetřovaného souboru	41
3.3.2	Odběr a zpracování biologických vzorků	42
3.3.3	Izolace a charakterizace celkové RNA	42
3.3.4	Expresní arrays	43
3.3.4.1	Syntéza cRNA	43
3.3.4.2	cRNA array	44
3.3.5	Kvantitativní RT-PCR v reálném čase (qPCR)	46
3.3.5.1	Ošetření vzorku RNA pomocí DNase a syntéza cDNA	47
3.3.5.2	Optimalizace qPCR	48
3.3.5.3	Postup vyšetření souboru	50
3.3.5.4	Kvantifikace změn genové exprese a jejich statistické vyhodnocení	52
3.4	STANOVENÍ SÉROVÝCH KONCENTRACÍ VYBRANÝCH ADIPOKINŮ A DALŠÍCH BIOCHEMICKÝCH MARKERŮ Z MATERNÁLNÍ A FETÁLNÍ KRVE PŘI PORODU	53
3.4.1	Vlastnosti vyšetřovaného souboru	53
3.4.2	Odběr a zpracování krevních vzorků	53
3.4.3	Stanovení sérových koncentrací vybraných adipokinů a dalších biochemických parametrů.	53
3.4.4	Metody měření inzulínové senzitivity	54

3.4.5	Statistické zpracování výsledků	56
4	VÝSLEDKY	57
4.1	CHARAKTERIZACE ZMĚN SÉROVÝCH KONCENTRACÍ ADIPONECTINU V ZÁVISLOSTI NA MENSTRUACNÍM CYKLU	57
4.2	CHARAKTERIZACE EXPRESNÍHO PROFILU TUKOVÉ TKÁNĚ A PLACENTY VE VZTAHU KE GESTAČNÍMU DIABETU MELLITU -EXPRESNÍ ARRAYS	59
4.3	CHARAKTERIZACE EXPRESNÍHO PROFILU TUKOVÉ TKÁNĚ A PLACENTY VE VZTAHU KE GESTAČNÍMU DIABETU MELLITU - qPCR	63
4.3.1	Expres adipokinů	66
4.3.2	Expres GLUT 3 a 4, placentárního laktogenu , prolaktinu a PPAR α	69
4.3.3	Expres IL-6, IL-8 a CD68	71
4.3.4	Expres inzulinázy, IRS2 a hormon senzitivní lipázy	73
4.3.5	Expres LDL receptoru, estrogenních receptorů 1, 2 a fruktóza-1,6-bisfosfatázy 1	75
4.3.6	Genová expres katalytických podjednotek α a β fosfatidylinositol-3-kinázy	77
4.3.7	Expres inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1, insulin-like growth faktoru vazebného proteinu 1 a inducibilní NO syntázy	77
4.4	STANOVENÍ SÉROVÝCH KONCENTRACÍ ZÁKLADNÍCH ADIPOKINŮ Z FETÁLNÍ A MATERNÁLNÍ KRVE U TĚHOTNÝCH (S / BEZ GESTAČNÍHO DIABETU MELLITU) A DALŠÍCH BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ Z MATERNÁLNÍ KRVE	79
4.4.1	Sérové koncentrace – rozdíly mezi sledovanými skupinami	79
4.4.2	Vzájemné korelace klinických a biochemických parametrů	81
4.4.3	Porovnání sérových koncentrací vybraných parametrů u těhotných proti stavu mimo těhotenství	81
4.4.4	Vzájemný vztah změn genové exprese a sérových koncentrací	82
5	DISKUZE	84
5.1	CHARAKTERIZACE ZMĚN SÉROVÝCH KONCENTRACÍ ADIPONECTINU V ZÁVISLOSTI NA MENSTRUACNÍM CYKLU	84
5.2	ZMĚNY PRODUKTŮ TUKOVÉ TKÁNĚ A PLACENTY V TĚHOTENSTVÍ KOMPLIKOVANÉM GESTAČNÍM DIABETEM MELLITEM (<i>společná diskuze k bodům 4.2 – 4.4</i>)	85
5.2.1	Kvantifikace genové exprese: qPCR vs array	85
5.2.2	Hodnocení změn adipokinů a jejich regulátorů	88
6	SOUHRN	96
7	SUMMARY	98

8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	100
9	LITERATURA	103
10	PODĚKOVÁNÍ	120
11	PŘÍLOHA 1: SEZNAM GENŮ ANALYZOVANÝCH POMOCÍ OLIGO GEARRAY HUMAN INSULIN SIGNALING PATHWAY MICROARRAY (OHS-030; SUPERARRAY)	121

1 TEORETICKÝ ÚVOD

Tuková tkáň byla až do poloviny 90. let minulého století vnímána pouze jako tkáň, jejímž jediným významem je uložení lipidových energetických rezerv organismu a jeho tepelná a mechanická ochrana. Byla tedy považována za pasivní zásobárnu energie regulovanou vegetativním nervovým systémem a hormony, aniž by byla sama do této regulace energetického metabolismu organismu zapojena [1]. K zásadní změně ve vnímání role tukové tkáně přispěla v roce 1994 identifikace hormonu zvaného leptin, který je produkován převážně právě tukovou tkání [2]. Tímto objevem a současně narůstající incidencí obezity a diabetu mellitu v ekonomicky vyspělých zemích byl nastartován zájem o objevení možné aktivní role tukové tkáně jako endokrinního orgánu, který se sám spolupodílí na regulaci energetického metabolismu a inzulínové rezistence. Výsledkem těchto studií byla identifikace řady dalších proteinů produkovaných tukovou tkání, jejichž fyziologický resp. patofyziologický význam v organismu je až dosud intenzivně studován [1]. V současné době je tedy tuková tkáň vímána jako důležitý endokrinní orgán, který hraje podstatnou roli v integraci endokrinních, metabolických a zánětlivých signálů podílejících se na kontrole energetické homeostázy [3]. Bioaktivní proteiny secernované tukovou tkání do cirkulace jsou nazývány adipokiny, resp. adipocytokiny [3,4]. Jsou mezi ně řazeny leptin, TNF- α (tumor necrosis factor-alpha), PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), adiponectin, resistin, adiposin a ASP (acyl stimulating protein) [3,5]. Všechny tyto zmíněné signální molekuly se podílejí (často ne zcela známým mechanismem) na regulaci inzulínové senzitivity, tedy regulaci citlivosti buněk periferních tkáních k účinkům inzulínu jako principiálního regulátoru intermediálního metabolismu.

V průběhu těhotenství dochází i za fyziologických podmínek ke změnám inzulínové senzitivity v periferních tkáních matky a u predisponovaných jedinců se v tomto období může zhoršená inzulínová senzitivita vystupňovat až do klinického obrazu gestačního diabetu mellitu. Ačkoliv je tento stav ve většině případů přechodný, vždy znamená zvýšené riziko následného rozvoje diabetu mellitu (DM) 2. typu [6].

Ačkoliv hlavním hormonem ovlivňujícím interorgánový i intracelulární metabolismus glukózy je bezpochyby inzulín, výzkumy posledních let naznačují, že úloha adipokinů v regulaci energetického metabolismu je velmi podstatná nejen na úrovni vlastní tukové

tkáně, ale rovněž na úrovni centrální. Kromě toho se řada adipokinů podílí i na regulaci imunitního systému.

Jedním z hlavních úkolů současného výzkumu je charakterizace generických faktorů angažovaných v přenosech signálů těchto metabolických regulátorů, která by měla být využita z hlediska časné diagnostiky a odhadu rizika vzniku inzulínové rezistence a následného rozvoje DM 2. typu.

1.1 Inzulínová senzitivita , inzulínová rezistence a gestační diabetes mellitus

1.1.1 Inzulínová senzitivita, rezistence

Inzulínová senzitivita je definována jako účinnost inzulínu při snižování glykémie přímým ovlivněním vstupu glukózy do svalových a tukových buněk a současně zvýšenou glykogenezou a sníženou glukoneogenezou v hepatocytech [7].

Inzulínová rezistence (IR) je stav organismu, při kterém je signifikantně snížená schopnost buněk adekvátně reagovat na stimulaci inzulínem, v důsledku čehož je pro udržení normoglykémie třeba větší množství inzulínu [7, 8]. Snížená schopnost inzulínu stimulovat transport glukózy do buněk inzulín dependentních tkání a její intracelulární utilizaci je společně s přítomností dyslipidémie (zvýšení triacylglycerolů a snížení HDL cholesterolu v krvi), hypertenze a hyperinzulinémie řazena do syndromu inzulínové rezistence [8]. Součástí toho syndromu může být také hyperurikémie nebo dna, centrální obezita, hyperandrogenismus, hyperkoagulační stav a defekty fibrinolýzy, steatóza jater a zvýšená incidence kardiovaskulárních onemocnění [9]. Snížení inzulínové senzitivity může být buď přechodné (např. při stresu, těhotenství či infekci) nebo chronické, které je možno zaznamenat při obezitě nebo diabetu mellitu (DM) 2. typu [7]. Inzulínová rezistence může mít také další příčiny – například poruchy hormonální (katecholaminy, glukokortikoidy nebo růstový hormon) nebo mutační poruchy signální kaskády inzulínového receptoru (alterace vlastního inzulínového receptoru nebo jeho substrátů) [8]. Za krátkodobé, ale periodicky se opakující, lze považovat také změny inzulínové senzitivity v průběhu menstruačního cyklu u ovulujících žen, kdy bylo popsáno postupné narůstání inzulínové rezistence během menstruačního cyklu s nejnižší inzulínovou rezistencí ve fázi folikulární, zvýšením ve fázi ovulační a nejvyšší rezistencí vůči účinkům inzulínu ve fázi luteální [10].

Prvním klinicky detekovatelným projevem porušení inzulínové senzitivity je porucha glukózové tolerance, která se projeví existencí pozátěžové hyperglykémie. Normální sérová koncentrace glukózy pro dospělé jedince je 3,9-5,6 mmol/l (referenční meze centrální laboratoře ÚKBLD 1. LF UK a VFN - <http://ukb.lf1.cuni.cz>), a toto rozmezí glykémie je v organismu pečlivě regulováno. Jak již bylo řečeno, hlavní hypoglykemizující účinek má inzulín, kontraregulačně proti účinkům inzulínu působí glukagon, kortizol, růstový hormon, lidský placentární laktogen, katecholaminy, hormony štítné žlázy a somatostatin [11].

Abnormální glukózová tolerance, respektive inzulínová senzitivita může být spojena se subklinicky probíhajícím chronickým zánětem, který se projevuje signifikantní elevací sérových koncentrací IL-1, IL-6, TNF α a CRP a poklesem adiponectinu a IL-10 [12].

1.1.2 Inzulín

Inzulín (INS, OMIM 176730) je peptidový hormon produkováný β -buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu. Jeho primární úloha spočívá v regulaci metabolismu glukózy, avšak významně se také podílí na řízení metabolismu lipidů ovlivňuje proteosyntézu a uplatňuje se v regulaci buněčného růstu a diferenciaci [13]. Všechny tyto účinky inzulínu jsou zprostředkovány jeho interakcí s inzulínovým receptorem. *

1.1.2.1 Syntéza a uvolňování inzulínu

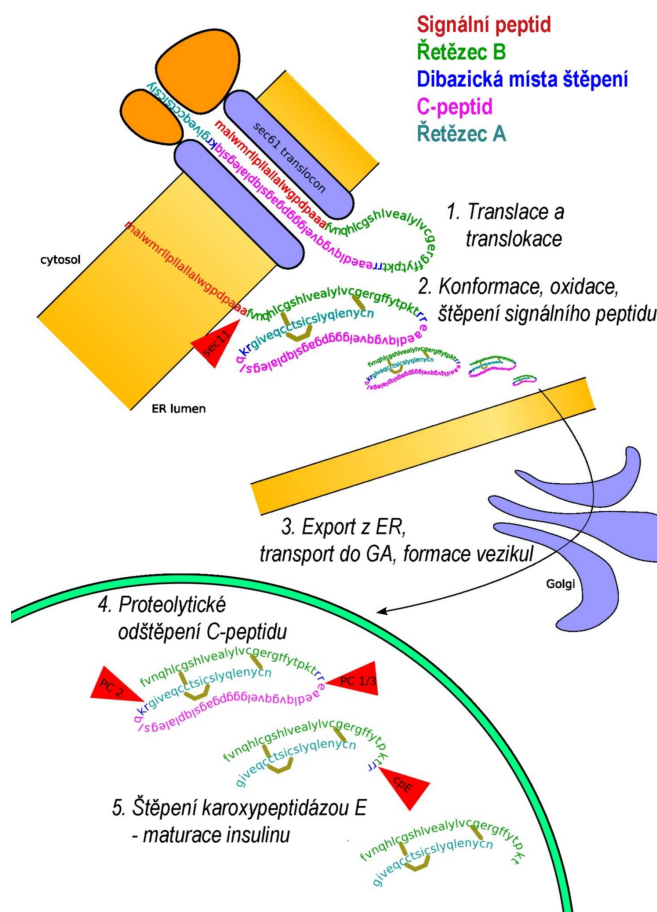
Gen pro inzulín je lokalizován na 11. chromozómu a je tvořen třemi exony a dvěma introny. Exon 2 kóduje signální peptid, řetězec B a část C-peptidu, exon 3 kóduje zbytek C-peptidu a řetězec A. Inzulín je syntetizován jako proinzulín v endoplazmatickém retikulu, z něj je mikrosomálními enzymy odštěpením signálního peptidu připraven proinzulín, který je skladován v sekrečních granulech, ve kterých je enzymaticky rozštěpen na ekvimolární množství C-peptidu a vlastního inzulínu. Vyštěpením C-peptidu vzniknou 2 peptidové řetězce inzulínu A a B, které pomocí dvou disulfidických můstků vytvoří definitivní formu inzulínu (Obr. 1).

Fyziologická funkce C-peptidu není dosud zcela objasněna, ale měření jeho sérových koncentrací se používá spolu s koncentracemi inzulínu a proinzulínu pro hodnocení endogenní sekrece inzulínu [7].

* případně s IGFR

Primárním sekretagogem pro inzulín v β -buňkách Langerhansových ostrůvků je glukóza, která prostřednictvím inzulín independentních GLUT 2 transportérů vstupuje facilitovanou difúzí do β -buněk v závislosti na koncentračním gradientu. Po vstupu do buňky je glukóza bezprostředně fosforylována glukokinázou na glukóza-6-fosfát, který dále vstupuje do glykolýzy a poskytuje energetické substráty reakcím Krebsova cyklu, výsledkem čehož je kumulace ATP v β -buňkách. Následkem zvýšení poměru ATP/ADP dojde k uzavření K^+ transportních kanálů, které vyvolá depolarizaci buněčné membrány. Po depolarizaci se otevrou napěťově závislé Ca^{2+} kanály, Ca^{2+} vstupují do buňky a iniciují exocytózu zásobních granul obsahujících inzulín a C-peptid, čímž dojde k vyplavení inzulínu do krve [7]. Glukóza stimuluje nejen sekreci inzulínu z β -buněk, ale i jeho maturaci z proinzulínu.

Obrázek 1. Schéma syntézy a maturace inzulínu v β -buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu.



Po uvolnění do krevního oběhu interaguje cirkulující inzulín s cílovými tkáněmi, které mají v cytoplazmatických membránách svých buněk přítomný inzulínový receptor. Biologický poločas inzulínu uvolněného do krevního oběhu je přibližně 4-6 minut [13].

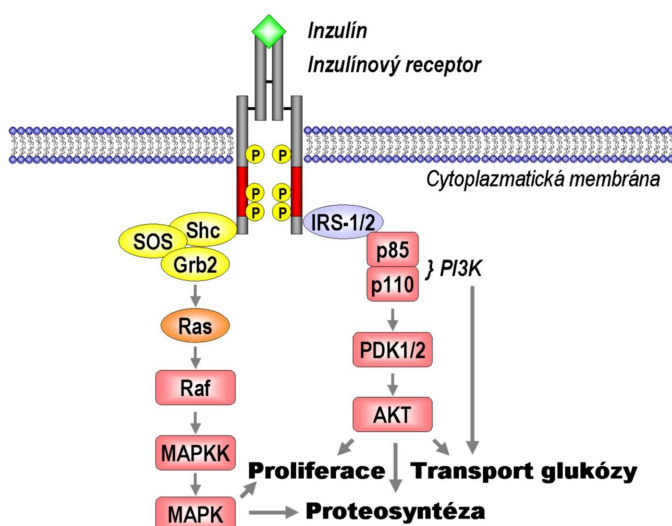
1.1.2.2 Inzulínová signalizace v buňkách periferních tkání

Působení inzulínu na buňky periferních tkání je umožněno díky jeho vazbě na inzulínový receptor (INSR; OMIM 147670) – heterotetramer tvořený dvěma extracelulárními α -podjednotkami, které jsou disulfidickými můstky spojeny se dvěma transmembránovými β -podjednotkami. β -podjednotky mají vlastní tyrosinkinázovou aktivitu, aktivovanou interakcí ligandu (obvykle inzulínu) a receptoru. Po aktivaci inzulínového receptoru dochází v závislosti na aktuální dostupnosti transdukčních modulů k přenosu signálu dvěma hlavními cestami: (i) cestou MAP-kináz facilitovanou aktivací Ras/Raf nebo (ii) prostřednictvím kinázy AKT (PKB) stimulované IRS a PI3K (Obr. 2) [14].

Obrázek 2. Schéma hlavních signálně-transdukčních drah aktivovaného inzulínového receptoru (INSR). Po aktivaci inzulínového receptoru inzulínem dochází k autofosforylaci tyrosinových zbytků (Y:965, 972,1158,1162,1163,1328,1134) v intracytoplazmatické části β -podjednotek inzulínového receptoru. Fosforylovaná forma inzulínového receptoru poskytuje vazebné místo pro navázání adaptorových proteinů, které je schopna fosforylovat. Jejich výběr ovlivňuje kromě aktuální přítomnosti v blízkosti cytoplazmatické membrány i různý fosforylační stav INSR.

Navázáním Shc dochází k přenosu signálu cestou aktivace Ras proteinu a následně MAP kinázové kaskády iniciované kinázou Raf. Tato signálně-transdukční dráha se podílí především na ovlivnění proteosyntetické a promitotické kapacity stimulované buňky.

Druhou základní možností je interakce INSR s jeho inzulín-receptor substrátovými molekulami (IRS1-4). Jejich asociace vytvoří platformu pro aktivaci fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K; p85+p110), jejímž terminálním efektem je proteinkináza AKT (proteinkináza B - PKB). Tato aktivace má metabotropní účinky mediované syntézou derivátů PIP (aktivace inzerce GLUT4 do membrány, syntéza glykogenu a triacylglycerolů a inhibice lipolýzy v tukové tkáni prostřednictvím inhibice hormon senzitivní lipázy - HSL) a ovlivněním transkripce má účinky prorůstové (s inhibicí apoptózy) a sekundárně stimuluje proteosyntetickou aktivitu buňky.



Výsledek aktivace inzulínového receptoru závisí i za fyziologických podmínek na typu stimulované buňky a přítomnosti molekul ovlivňujících signální kaskádu receptoru (signalizace TNF, množství intracelulárních substrátů – dNTP's, ATP, apod.; Obr. 3).

Metabotropní účinky, jejichž smyslem je rychlý postprandiální přesun glukózy především do tkání s vysokou utilizační kapacitou, vedou k aktivaci intracelulárního transportu glukózy v inzulin dependentních buňkách, aktivaci syntézy glykogenu (glykogen syntázy) a glykolýzy, inhibici glykogenolýzy (glykogen fosforylázy) a glukoneogeneze v jaterních a svalových buňkách. V tukových buňkách nastává aktivace syntézy mastných kyselin a inhibice lipolýzy a β -oxidace.

Kromě metabotropní aktivity nastává po stimulaci inzulinového receptoru i významná prorůstová stimulace. Ta je často odvislá na přítomnosti dalších promitotických růstových faktorů a již zmiňované přítomnosti stavebních a energetických substrátů nezbytných pro růst, případně replikaci buňky [11].

Obrázek 3. Přehled signálně-transdukčních drah aktivovaných inzulinovým receptorem.

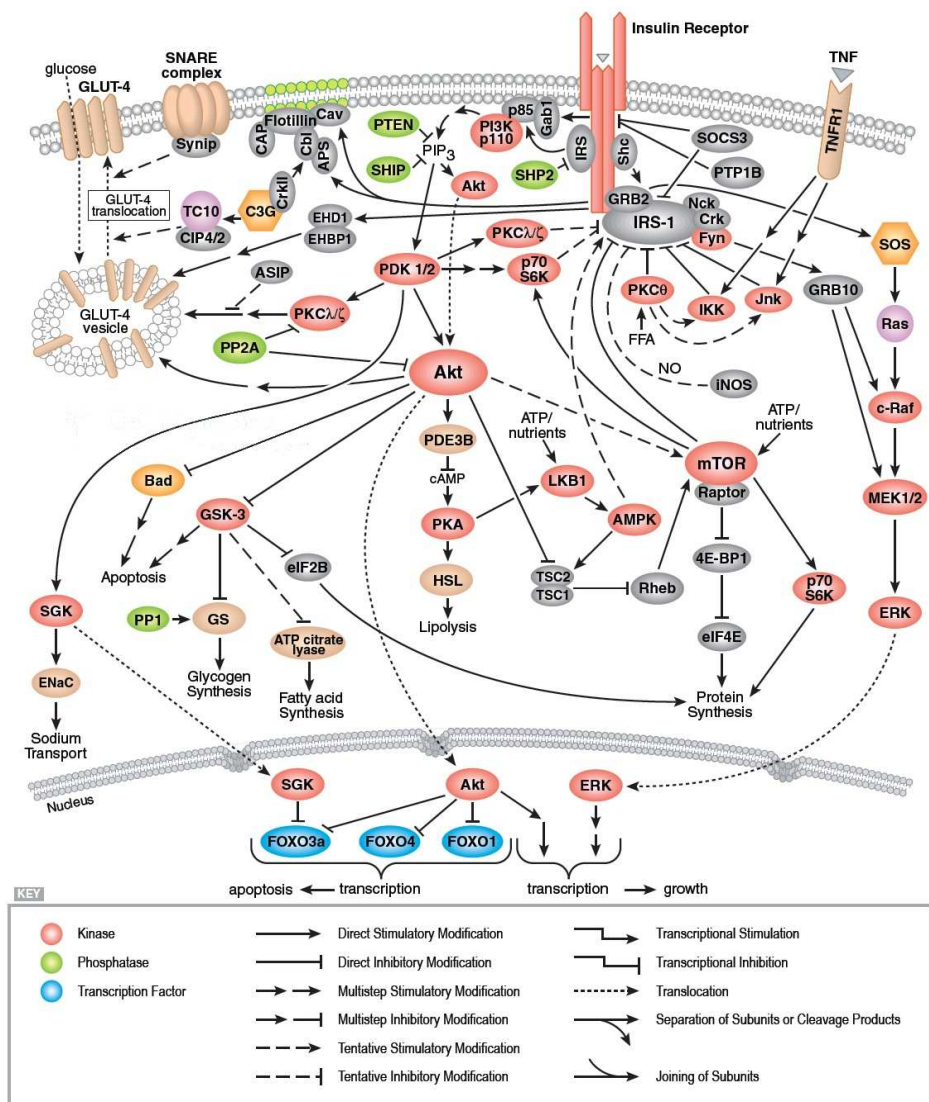


Schéma: www.cellsignal.com

Metabolická signalizace inzulínového receptoru je ovlivněna především na úrovni IRS1-4. Tyto adaptorové molekuly se v rozdílné kvalitě i kvantitě exprimují v různých tkáních. Kromě aktivací fosforylace na tyrosinových zbytcích jejich polypeptidového řetězce jsou negativně ovlivněny i fosforylací serinovými kinázami (např. ERK, TOR) aktivovanými lipidovými a cytokinovými stimuly, které se podílejí na rozvoji inzulínové rezistence provázející reakci akutní fáze [15].

1.1.2.3 Degradace inzulínu

Za nejdůležitější systém pro degradaci inzulínu je považována vysoce konzervativní metalopeptidáza - inzulín degradující enzym (viz dále), dalšími zúčastněnými v degradaci inzulínu jsou protein disulfidizomeráza a katepsin D [13]. Hlavními místy inzulínové clearance jsou játra a ledviny. Dalšími buňkami schopnými degradovat inzulín jsou buňky tukové a svalové tkáně, gastrointestinálního traktu, fibroblasty, monocyty a lymfocyty obsahující inzulínové receptory [13]. Inzulín po interakci se svým receptorem může být v intaktní formě opět vrácen do cirkulace nebo je společně s receptorem internalizován do buňky, kde se může vyskytovat v cytosolu, jádře, Golgiho aparátu a nebo v lyzosomech [13]. Také část internalizovaného inzulínu se může v intaktní nebo jen částečně degradované formě vrátit do cirkulace (biologická aktivita těchto parciálně degradovaných partikulí inzulínu není známa) [13]. V endosomech je inzulín navázaný na svůj receptor substrátem pro inzulín degradující enzym [13].

Inzulín degradující enzym, inzulináza

Inzulináza (IDE; OMIM 146680) je neutrální thiolová metaloendopeptidáza o velikosti 110 kD vyžadující pro svou proteolytickou aktivitu přítomnost Zn^{2+} a volné thiolové skupiny. IDE je schopna degradovat kromě inzulínu také další peptidy, např. β -amyloid, glukagon, amylin, atriální natriuretický faktor a IGF I a II [16, 17]. Všechny tyto substráty mají sice odlišnou primární strukturu, ale podobnou strukturu sekundární [18, 19]. Preferenčně ovšem IDE degraduje právě inzulín se současnou inhibicí štěpení ostatních substrátů [20]. Za nenedenaturujících podmínek byla izolována jako dimery a trimery [21] a byla izolována spolu s multikatalytickou proteinázou, což umožňuje předpokládat, že je součástí multikatalytických proteinových komplexů [18]. Nachází se v cytosolu, peroxisomech, endosomech, granulárním endoplazmatickém retikulu, na buněčném povrchu a také v extracelulárním kompartmentu [16, 17]. Mechanismus, jakým je uvolňována do extracelulárního prostoru není zcela zřejmý, ale byla popsána přítomnost intaktní IDE

v cerebrospinálním moku za fyziologických podmínek [21]. Zda a jakým způsobem je schopna extracelulárně se vyskytující inzulináza degradovat inzulín není dosud známo.

1.1.3 Molekulární podstata vzniku inzulinové rezistence a DM

Na vzniku inzulinové rezistence se účastní řada genetických, epigenetických a environmentálních faktorů. Z pohledu naší populace bude pravděpodobné, že rozhodující měrou se na vzniku inzulinové rezistence a následně DM 2. typu bude podílet nepoměr mezi kalorickým příjmem a energetickým výdejem jehož výsledkem je vznik obezity. U obézních osob se z hypertrofické tukové tkáně zvyšuje výdej volných mastných kyselin, glycerolu, hormonů a tkáňových faktorů (často s proinflamatorním působením) podmiňujících vznik inzulinové rezistence, ke které přispívá progresivní dysfunkce β -buněk Langerhansových ostrůvků [22]

Na rozvoji inzulinové rezistence se rovněž podílí i poruchy regulace energetické homeostázy vznikající na úrovni jejích regulačních center v CNS v oblasti paraventriculárních jader hypotalamu, kde inzulín (společně s leptinem) sehrávají důležitou úlohu v regulaci příjmu potravy (např. regulací orexigenního neuropeptidu Y; NPY) [23] Pro signální transdukcí INSR v hypotalamu je prioritní aktivační cesta IRS-PI3K, na které kooperuje i leptinová signalizace.

Na úrovni inzulinové signalizace buněk periferních tkání můžeme příčiny inzulinové rezistence najít v podobě prereceptorových, receptorových nebo postreceptorových poruch [24]. Pre-receptorové a receptorové poruchy (např. výskyt protilátek proti INSR, mutace v INSR) se vyskytují zřídka. Zdaleka nejčastějšími jsou tak poruchy postreceptorové signalizace INSR. Jak již bylo uvedeno, inzulinová signální kaskáda zahrnuje dva základní transdukční mechanismy: (i) aktivaci IRS s následnou aktivací PI3K a AKT s dominantními metabotropními aktivitami, a (ii) aktivaci Grb2/Sos vedoucí k aktivaci Ras/MAPK signalizace s dominantní prorůstovou aktivitou. Obě cesty jsou ovlivněny řadou dalších signálních kaskád a odlišně regulovány v jednotlivých tkáních.

Snížení inzulinové sekrece (resp. insenzitivita k účinkům inzulinu) zasahuje pět hlavních orgánových kompartmentů podílejících se na vzniku inzulinové rezistence a toxicity: snížením inzulinové signalizace v hypotalamu způsobuje zvýšení příjmu potravy s následnou

obezitou, snížená inhibice produkce glukózy v hepatocytech má za následek hyperglykémii, ke které přispívá snížená utilizace cirkulující glukózy ve svalových buňkách, a zvýšení lipolýzy v adipocytech má za následek vzrůst koncentrací cirkulujících volných mastných kyselin. To, společně se zvýšenou glykemií se dále podílí na prohloubení poruchy β -buněk (tzv. glukolipotoxický účinek) [22].

1.1.4 Inzulínová rezistence v těhotenství a gestační diabetes mellitus

Změny probíhající v mateřském organizmu během celého těhotenství jsou velmi rozsáhlé a týkají se téměř všech biologických systémů. Dochází ke změnám orgánovým (zejména patrným u orgánů pohlavních) a adaptaci orgánových systémů na zvýšenou zátěž (např. zvýšená zátěž kardiovaskulárního systému v důsledku zmnožení cirkulujících tělních tekutin), ale také ke změnám metabolickým. Bazální metabolismus stoupá během gravidity v průměru o 15-20% (zejména v důsledku zvýšené spotřeby O_2 v závislosti na růstu plodu a mateřských tkání). Zásadní jsou také změny hormonální, které adaptují mateřský organizmus na existující graviditu již od úplného začátku [25]. Kromě pro těhotenství specifické produkce hormonů tvořených placentou (viz *Odd. 1.1.4.1 Placenta jako endokrinní orgán*) se mění i sérové koncentrace hormonů fyziologicky se v organizmu vyskytujících i před těhotenstvím. V hypofýze je utlumena pulsatilní produkce gonadotropinů (LH, FSH) a klesá i sekrece růstového hormonu (GH), zatímco produkce prolaktinu a proopiomelanokortinu (POMC), jako společného prekurzoru pro ACTH, TSH, MSH, lipotropní hormon (LPH) a β -endofin, je zvýšena. Neurohypofýza secernuje od začátku porodu a během období laktace výrazné množství oxytocinu. V důsledku zvýšené centrální stimulace výrazně stoupá produkce kortizolu kůrou nadledvin (zona fasciculata) a během celého těhotenství stoupají jeho sérové koncentrace, funkce dřeně nadledvin není těhotenstvím ovlivněna [25]. Ve fyziologickém těhotenství dochází v důsledku zvýšené estrogenní stimulace je vyšší produkce TBG (thyroid binding globulin), který je hlavním plazmatickým transportérem (váže přibližně 99%) pro tyroxin (T4) a trijodtyronin (T3). V důsledku současného zvýšení produkce T3 a T4 štítnou žlázou je množství volných, tedy biologicky aktivních hormonů zhruba stejné, jako mimo těhotenství [26].

1.1.4.1 Placenta jako endokrinní orgán

Interakce embrya s mateřským organizmem začíná již při nidaci embrya, kdy syncytiotrofoblast produkuje enzymy i parakrinně působící látky (interleukiny, proteázy, prostacyklin I₂, prostaglandin E₂, metalloproteinázu 9 aj.) [25], které umožňují průnik blastocysty do děložního stromatu. Jako reakce na nidaci blastocysty probíhá v přilehlém stromatu a děložní sliznici soubor změn nazývaný decidualizace, který se rychle po proběhnutí implantace rozšíří na celou dutinu děložní. Placenta se záhy po placentaci stává endokrinním orgánem. Produkuje steroidní i proteinové hormony, které vstupují převážně do mateřské krve. Většina placentárních hormonů jsou analoga hormonů mateřských, které pomáhají v adaptaci mateřského organismu na těhotenství [25].

Hormonem charakteristickým pro placentu je lidský choriový gonadotropin (hCG, OMIM 118860 – β podjednotka), glykoprotein, který začíná být produkován lidskou placentou mezi 10. – 12. dnem po oplodnění a jehož sérové koncentrace v mateřském organismu se zvyšují až do 60. – 90. dne gestace (u fyziologické gravidity dochází ke zdvojnásobení jeho sérových koncentrací každé 2-3 dny). V dalším období těhotenství se jeho koncentrace sníží a zůstávají stejné až do porodu [25]. Rodina glykoproteinů, do které je hCG řazen, zahrnuje také hypofyzární hormony LH, FSH a TSH (tyreotropin) – a všechny tyto glykoproteiny fungují jako nekovalentně vázané heterodimery. α-podjednotka je pro všechny tyto čtyři hormony společná a endokrinní funkci dimeru určuje podjednotka β [27]. hCG interaguje s corpus luteum a stimuluje ho v počátku těhotenství ke tvorbě progesteronu (corpus luteum je do 5. – 7. týdne gestace jediným místem produkce progesteronu, poté se jím stává placenta). Úlohou hCG je také ovlivnění syntézy steroidních hormonů placentou, stimulace štítné žlázy matky, a decidualizace děložní sliznice a stromatu. Dalším glykoproteinem produkováným placentou je gonadotropin releasing hormon (GnRH) – strukturálně identický s hormonem hypotalamu. Jeho sérové koncentrace korelují s koncentracemi hCG [25].

Placenta je v době těhotenství významným zdrojem steroidních hormonů – progesteronu i estrogenů – estron, estradiol a estriol (ve spolupráci s plodem a mateřským organizmem), i hormonů kortikotropních. Syntetizuje také POMC, který je stejně jako v hypofýze prekurzorem pro řadu hormonů. Na rozdíl od POMC hypofyzárního se ovšem do mateřské cirkulace dostává též část nerozštěpeného proopiomelanokortinu.

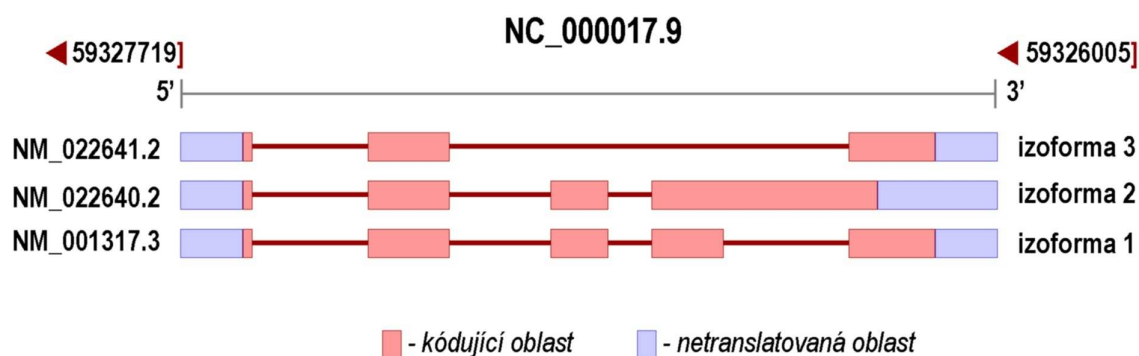
Placenta produkuje také CRH (kortikotropin-releasing hormon), jehož syntéza začíná kolem 7. týdne gestace a sérové koncentrace se zvyšují až do porodu. Část placentou produkováného

CRH se dostává i do fetální krve, kde se předpokládá jeho působení na nadledviny plodu. Biologicky aktivní je pouze jeho volná frakce, většina CRH se vykytuje vázaná na CRH binding protein (CRHBP), jehož produkce v mateřském organizmu se během těhotenství zvyšuje také, poměr mezi CRH a jeho vazebným proteinem, a tedy i biologická dostupnost CRH, se mění až několik týdnů před začátkem porodu [25].

Kromě dosud zmíněných hormonů je syncytiotrofoblast zdrojem proteinů patřících do rodiny růstových hormonů, která je tvořena 5 geny lokalizovanými v lokusu 17q22-q24. Do této rodiny je řazen v hypofýze exprimovaný růstový hormon (GH, GH1, GHN, growth hormone normal, OMIM 139250) a dále 4 geny exprimované v placentě – CSH1 (choriový somatotropní hormon 1, OMIM 150200), CSH2 (choriový somatotropní hormon 2, OMIM 118820), CSL (choriovému somatotropinu podobný hormon, OMIM 603515) a GHV (GH2, placentární varianta růstového hormonu, OMIM 139240) známý také jako hPGH (human placental growth hormone) [28]. Sekrece GHV však není regulována GH-RH (growth hormone releasing-hormone), jako je tomu u jeho hypofyzárního analogu. Všechny geny vykazují velkou strukturní i funkční podobnost, každý z nich je kódován pěti exony a má několik transkripčních variant, z nichž pouze některé jsou solubilní a plně funkční.

Placencou nejvíce secernovaným růstovým hormonem na konci těhotenství je CSH1 [25], známý také jako lidský placentární laktogen (hPL) nebo CSA (choriový somatotropin A). hPL se vyskytuje ve třech transkripčních variantách 1 – 3 (Obr. 4). Transkripční varianta 1 obsahuje všech 5 exonů, transkripční varianta 2 je nejdelší a obsahuje navíc čtvrtý intron (intron D), čímž získává transmembránovou doménu a není solubilní, ve variantě 3, která je transkribována naprosto minoritně, chybí exon 3 a 4. hPL je placencou secernován do maternální i fetální cirkulace po šestém týdnu gestace [29].

Obrázek 4. *Transkripční varianty lidského placentárního laktogenu.*



hPL má však účinky jak inzulínu podobné, tak proti inzulínu působící. V *in vitro* studiích byl prokázán jeho podíl na zvýšení lipolýzy a množství volných mastných kyselin (FFA) v adipocytech [29], na druhé straně je hPL schopen na krysích modelech stimulovat růst pankreatických ostrůvků a u lidí stimulovat sekreci inzulínu [30] hPL a GHV působí v mateřském organizmu synergně ve stimulaci produkce IGF a modulují intermediární metabolismus s cílem zvýšit dostupnost glukózy a aminokyselin pro plod [29].

Syncytiotrofoblast je také zdrojem mnoha dalších biologicky aktivních látek, u kterých je znám nebo předpokládán určitý podíl na regulaci energetického metabolismu celého organismu. Mezi tyto biologicky aktivní látky produkované placentou jsou řazeny i některé adipokiny, látky produkované tukovou tkání (viz *Odd. 1.2 Tuková tkáň a její úloha v regulaci energetického metabolismu a inzulínové senzitivity*). Je prokázáno, že z těchto adipokinů placenta produkuje leptin [31,32], resistin [33] a TNF α [34]. U dalšího adipokinu – adiponectinu dlouhou dobu převládal názor, že je produkován výhradně adipocyty, přesto se v posledních letech objevují i práce, které schopnost produkovat adiponectin (mRNA i protein) přisuzují také buňkám placentárním [35,36].

1.1.4.2 Zvýšená inzulínová rezistence u těhotných

I při fyziologicky probíhajícím těhotenství dochází k mírnému snížení glykémie nalačno s maximálním poklesem kolem 20. týdne gravidity, které je vyvolané kontinuální transplacentární facilitovanou difúzí glukózy cestou GLUT 1 a 3 transportérů, a ke zpomalení postprandiálního vzestupu glykémie přičítanému zpomalené peristaltice gastrointestinálního traktu těhotných v důsledku relaxace hladké svaloviny. Na druhé straně je popisováno 2-3 násobné zvýšení sérových koncentrací inzulínu proti stavu před graviditou. Tyto změny reflektující zvýšenou energetickou potřebu vyvíjejícího se plodu začínají na konci prvního trimestru a vrcholí před koncem termínové gravidity. Protože inzulín transplacentární bariérou neprochází, je pravděpodobné, že jeho zvýšená produkce má za úkol kompenzovat zvýšenou inzulínovou rezistenci periferních tkání těhotné ženy [26].

1.1.4.3 Gestační diabetes mellitus

Gestační diabetes mellitus (GDM) je porucha glukózové homeostázy či diabetes vzniklý během těhotenství. Jedná se celosvětově o jednu z nejčastějších komplikací těhotenství s prevalencí 5-7% ve Střední Evropě [37]. Incidence GDM se zvyšuje s věkem, kdy je popisována incidence 1% ve věku nižším než 20 let, 4% mezi 30-34 roky a až 7% u těhotných

ve věku 35-39 let [38], takže vzhledem k rostoucímu průměrnému věku rodiček v posledních letech je nárůst výskytu těhotných s GDM očekávatelný a nepřekvapující.

Diabetes v těhotenství se může rozvinout na základě stejných etiopatogenetických příčin, jako mimo těhotenství [39]. U většiny žen s GDM se vyskytuje dysfunkce β -buněk pankreatu, která se rozvíjí na podkladě chronicky probíhající inzulínové rezistence [39]. Jak již bylo řečeno, i u fyziologicky probíhajících gravidit je proti stavu mimo těhotenství zvýšená inzulínová rezistence. U žen s GDM se ale tato „fyziologická“ IR přidává navíc k inzulínové rezistenci chronicky probíhající a rozvine se obraz GDM. U většiny žen s GDM se v období po porodu – po odeznění působení tzv. v těhotenství fyziologicky přítomné inzulínové rezistence – normalizují sérové koncentrace glukózy, ale přesto u většiny těchto žen přetrvává vyšší IR, než u žen, které GDM neměly [39]. Ženy s GDM obvykle bývají více obézní než těhotné bez GDM, i když to není absolutní pravidlo. Longitudinální studie sledující změny inzulínové rezistence před graviditou, na začátku 2. a na konci 3. trimestru a následně postpartálně, prokázaly, že zvýšení IR u žen s GDM bylo přítomno u obézních i štíhlých [40, 41]. Přesto jsou hledány faktory spojující obezitu s rozvojem inzulínové rezistence také v těhotenství. Provedené studie sledovaly obvykle změny sérových koncentrací potencionálních biochemických mediátorů rozvoje inzulínové rezistence v těhotenství – např. zvýšení CRP a změny adipokinů (viz *Odd. 1.4 Změny adipokinů v těhotenství a při GDM*) u žen s GDM [39]. Poruchy interakce inzulínu s jeho receptorem ve svalových buňkách se nepokládají za možnou příčinu rozvoje GDM. Za jednu z možných příčin rozvoje GDM jsou však považovány možné alterace signálně transdukční dráhy inzulínového receptoru – např. abnormální subcelulární lokalizace GLUT4, nebo jiným způsobem vyvolaný pokles inzulínem-regulovaného transportu glukózy intracelulárně [39]. Dlouhou dobu převládal názor, že k rozvoji GDM dochází u žen, které nejsou schopny zvýšit produkci inzulínu β -buňkami pankreatu, a tak reagovat na zvýšenou inzulínovou rezistenci během těhotenství. Tento názor nebyl zcela potvrzen – i ženy s GDM jsou schopny velmi výrazně zvýšit během těhotenství sekreci inzulínu pankreatem v reakci na zvyšující se IR organismu matky, ovšem toto zvýšení je přibližně o 50% nižší než u zdravých těhotných [39]. Tento nález může být ukazatelem na dlouhodobou, do těhotenství subklinickou, deterioraci β -buněk pankreatu jako možnou příčinu rozvoje hyperglykémie a DM v následujících letech [39].

Malé množství žen s GDM (méně než 10%), tedy diabetem poprvé detekovaným v těhotenství, má některé laboratorní markery shodné s pacienty s autoimunitním DM 1. typu – mají přítomny protilátky proti ostrůvkovým buňkám pankreatu (anti islet cells antibodies)

nebo proti antigenům typickým pro β-buňky pankreatu (např. proti glutamátdekarboxyláze, anti-GAD). Takovéto ženy jsou obvykle, ale ne vždy, štíhlé a mohou postpartálně rychleji rozvinout diabetes mellitus než ženy bez přítomnosti těchto protilátek [39 , 42].

Stejně je možné v těhotenství poprvé diagnostikovat v podstatě preexistující diabetes s monogenní příčinou jeho vzniku. Některé z těchto monogenních mutací jsou autozomální, jiné jsou kódovány mitochondriální DNA – ty jsou ale obvykle spojeny s dalšími klinickými symptomy, jako je například hluchota. Autozomálně vázané monogenní příčiny diabetu jsou známy jako MODY diabetu (maturity-onset diabetes of the young) s typy 1-7. MODY, které bývají detekovány u těhotných žen jako GDM bývají obvykle podtypy MODY2 (mutace glukokinázy), MODY3 (mutace hepatocytárního nukleárního faktoru 1α) a MODY4 (mutace inzulin-promotor faktoru 1). Všechny monogenní typy diabetu detekované v těhotenství opět tvoří do 10% všech GDM [39].

Podle Americké klasifikace gynekologů a porodníků (ACOG) je diabetes mellitus v těhotenství klasifikován do skupin A-T, přičemž skupiny B-T jsou vyhrazeny pro DM existující již před těhotenstvím a skupina A je vyhrazena pro GDM (Tab. 1) [43].

Tabulka 1. Klasifikace GDM podle ACOG

Skupina	Glykémie nalačno	Glykémie 2 h po jídle	Léčba
A1	>5,3 mmol/l	<6,7 mmol/l	Dieta
A2	>5,3 mmol/l	>6,7 mmol/l	Dieta + inzulín

Podle míry rizika rozvoje gestačního diabetu mellitu se dělí těhotné do 3 skupin (Tab. 2) [25]. Je zřejmé, že provádění oGTT jako screeningové metody není povinné, ale vzhledem k tomu, že většina těhotných patří spíše do skupin se střední nebo vysokou mírou rizika rozvoje GDM, je toto vyšetření více méně prováděno plošně.

Tabulka 2. Dělení těhotných podle míry rizika rozvoje GDM a indikace k provedení oGTT.

Míra rizika	Rizikové faktory	Provedení oGTT
NÍZKÁ	<ul style="list-style-type: none"> • Věk <25 let • Není DM u příbuzných 1. linie • Normální hmotnost před těhotenstvím • Nejsou poruchy glukózového metabolismu • Nejsou negativní perinatální výsledky v anamnéze 	Není nutné
STŘEDNÍ	<ul style="list-style-type: none"> • Věk >25 let • Mírná obezita před těhotenstvím • Předchozí porod plodu s porodní hmotností >4000g 	Ve 24. - 28. týdnu gestace
VYSOKÁ	<ul style="list-style-type: none"> • Obezita těhotné s rodinnou anamnézou DM 2. typu • Existence GDM v předchozí graviditě • Glykosurie 	V 1. trimestru, pokud negativní, opakovat ve 24. - 28. týdnu gestace

Podrobnosti o provádění oGTT a jeho hraničních hodnotách sérových koncentrací glukózy v těhotenství jsou uvedeny v Oddílu 3.4.4 (Metody měření inzulinové senzitivity – oGTT).

Těhotné, u kterých jsou zaznamenány laboratorní projevy porušené glukózové tolerance, resp. GDM, jsou až do porodu pečlivě sledovány nejen porodníkem, ale také specialistou diabetologem. Primárně je zahájena dieta individuálně připravená pro každou těhotnou, respektující složení potravy: 35-40% sacharidy, 20-25% proteiny, 35-40% lipidy. Účinek použitých dietních opatření je sledován hodnocením postprandiální glykémie [25]. Hodnoty glykémie pro dobře kompenzovaný GDM používané na Gynekologicko-porodnické klinice 1. LF UK a VFN (MUDr. Moravcová) jsou $<5,5$ mmol/l nalačno a $<7,3$ mmol/l 1 hodinu po jídle. Pokud není těchto hodnot dietními opatřeními dosaženo, je třeba zahájit navíc terapii humánními rychle účinkujícími inzulíny – tuto terapii zcela řídí zkušený diabetolog ve spolupráci s těhotnou, aby se zamezilo rozvoji hyper- i hypoglykémie.

Těhotné s GDM mají proti fyziologicky probíhajícím graviditám vzhledem k rizikům s gestačním diabetem spojeným rizikům také až do porodu upravené vyšetřovací a UZ schéma. Mezi s GDM spojená porodnická rizika pro matku patří polyhydramnion, rozvoj hypertenze, porod operační cestou, větší porodní poranění. Pro plod matky s GDM jsou popsána tato rizika: intrauterinní úmrtí, diabetická fetopatie (makrosomie, plicní nezralost s rizikem vzniku respiratory distress syndromu – RDS, hypoglykemie, hypokalcemie, hyperbilirubinemie), traumatický porod a riziko vzniku diabetu v dětství a dospívání [25].

1.2 Tuková tkáň a její úloha v regulaci energetického metabolismu a inzulinové senzitivity

U dospělých lidských jedinců je přítomna pouze bílá tuková tkáň. Vlastnosti bílé tukové tkáně jsou odlišné v různých anatomických lokalizacích [44], přičemž podíl na regulaci inzulinové senzitivity, resp. rezistence, je přičítán zejména tukové tkáni v horní polovině těla [45]. Takzvaná trunkálně uložená tuková tkáň je tvořena masou tukové tkáně v oblasti hrudníku a břicha. Abdominální tuková tkáň je tvořena tukem subkutánním a intraabdominálním, ten je dále členěn na tuk viscerální (tvořený zejména tukem omentálním a mesenterickým) a tuk retroperitoneální [44]. Množství a rozložení tukové tkáně v lidském organismu je závislé na pohlaví a věku. Množství viscerální tukové tkáně vzrůstá v závislosti na věku u obou pohlaví, a to jak u štíhlých (BMI 18,5-24,9 kg.m⁻²), tak u jedinců s nadváhou (BMI 25-29,9 kg.m⁻²) i obézních (BMI>30 kg.m⁻²), ale u mužů je tato věková závislost výraznější než u žen. Tento rozdíl mezi pohlavími se však stírá u žen po menopauze [44].

Podle výsledků studií měřících množství tukové tkáně pomocí CT nebo NMR tvoří viscerální tuková tkáň 0,4-0,8% z celkového množství tuku v organismu, s vyšším procentuálním zastoupením u obézních jedinců [44, 46, 47].

V mnoha před rokem 1990 publikovaných studiích je popsána závislost rizika rozvoje onemocnění typu diabetu mellitu, hyperlipidémie, hypertenze a aterosklerózy na přítomnosti centrálního (abdominálního) typu obezity, avšak způsob měření obezity v těchto pracích pomocí poměru obvodu pasu a hýždí (WHR, waist-to-hip circumference ratio) nerozlišoval mezi kumulací abdominálního tuku subkutánního a viscerálního [44].

Celkové množství tukové tkáně v organismu je dáno vzájemným poměrem lipogeneze (syntézy mastných kyselin a následné syntézy TAG) a lipolýzy (resp. oxidace mastných kyselin) především v játrech, svalové a tukové tkáni. Lipogeneza se stimuluje zvýšeným energetickým příjmem (sacharidů, lipidů i bílkovin) v potravě a je inhibována vícenenasycenými mastnými kyselinami (např. snížením genové exprese např. syntázy MK a stearyl-CoA desaturázy v játrech) a lačněním [48]. Při lačnění dochází ke snížení lipogenezy v tukové tkáni a naopak je zvýšena lipolýza, vedoucí k odbourávání TAG v adipocytech. V játrech nastává zvýšení lipogeneze v důsledku zvýšeného přísunu volných mastných kyselin z periferie a následně k rozvoji mírné formy steatózy jater [48]. Tyto efekty jsou částečně zprostředkovány hormony, které lipogenezu inhibují (např. růstový hormon a leptin) nebo stimuluji (inzulín). Lačnění je provázeno významnými hormonálními změnami – dochází k elevaci sérové koncentrace glukagonu a růstového hormonu a ke snížení inzulínu a leptinu. Za intermediární molekuly zprostředkovávající pro- a nebo anti-lipogenní účinky jsou považovány SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein 1; OMIM 184756) a také PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma; OMIM 601487) [48].

Za klíčový enzym určující rychlost mobilizace volných mastných kyselin z tukové tkáně je považována hormon senzitivní lipáza (LIPE nebo HSL, OMIM 151750). LIPE stimuluje lipolýzu v tukové tkáni uskladněných triacylglycerolů (TAG) [49] i diacylglycerolů [50] na volné mastné kyseliny a glycerol. Je pod přímou hormonální i neuronální kontrolou – katecholaminy vyvolají prostřednictvím cAMP fosforylaci serinového rezidua v peptidovém řetězci LIPE, čímž dojde k její aktivaci, naopak účinkem inzulínu se LIPE defosforyluje, čímž dochází k její inaktivaci (antilipolytický účinek inzulínu) [49]. (Obr. 3, str. 10) Koncepce hormon senzitivní lipázy jako jediné lipázy intracelulárně existující v adipocytech byla

vyvrácena při pokusech na myších modelech s LIPE^{-/-}, u kterých se ovšem nevyvinula očekávaná obezita a přes chybějící aktivitu LIPE u nich byla prokázána probíhající lipolýza TAG. Současně však byla zvýšená kumulace diacylglycerolů v adipocytech, svalech a testes [51]. Další v nedávné době izolovanou lipázou je tzv. adipocytární TAG lipáza (ATGL, adipose triglyceride lipase), objevená nezávisle více týmy, proto se pro tento enzym používají kromě názvu ATGL [52] také jména iPLA2 (calcium-independent phospholipase A2 ζ) [53] nebo desnutrin [54]. Inzulín, isoproterenol a TNF α snižují expresi genů pro obě tyto adipocytární lipázy v 3T3-L1 adipocytech měřenou na úrovni mRNA; ovlivnění exprese sledovaných genů po přidání GH nebylo pozorováno [55]. Inzulín snižuje genovou expresi ATGL prostřednictvím p44/42 MAP kinázy [55] na postreceptorové úrovni signální kaskády inzulínového receptoru.

1.3 Charakteristika základních adipokinů

Prvním signálem, že tuková tkáň není pouhou pasivní zásobárnou energetických rezerv organismu, bylo objevení prvního adipokinu – leptinu v roce 1994 [2] a identifikace jeho receptoru o rok později [56]. Od té doby byla charakterizována řada dalších proteinů tukové tkáně, adipokinů, u nichž byl prokázán výrazný vliv na regulaci příjmu a výdeje energie v organismu i podíl na regulaci metabolismu tuků a glukózy a stavu inzulínové senzitivity (Obr. 5) [57]. Jedná se o látky primárně produkované tukovou tkání (jako v případě adiponectinu či leptinu) nebo produkované mimo jiné tukovou tkání (jako v případě resistinu, TNF α , IL-6, PAI1, ASP nebo adipsinu) [1].

1.3.1 Adiponectin

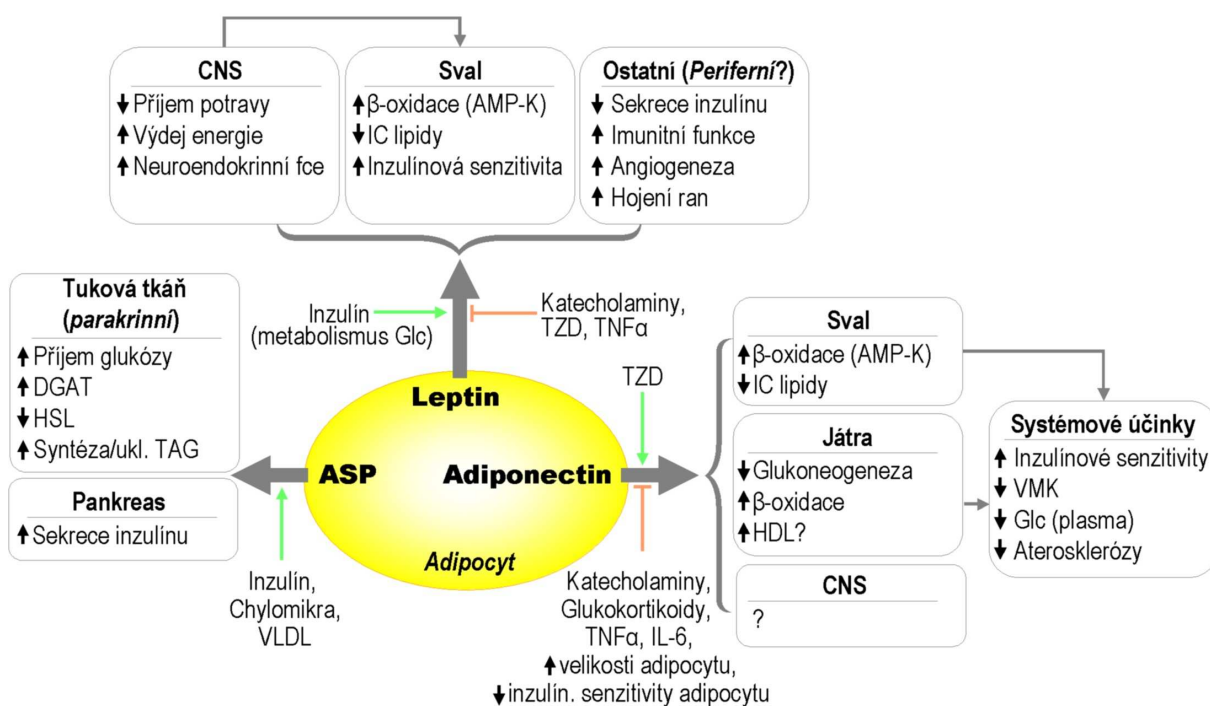
1.3.1.1 Struktura a uspořádání adiponectinu

Adiponectin (ADIPOQ, OMIM 605441) je protein o velikosti 28 – 33kDa [58,59] produkovaný abundantně a specificky adipocyty, který je rovněž považován za marker pozdní diferenciace adipocytů [59]. V letech 1995–1996 byl současně popsán čtyřmi nezávislými pracovními skupinami, proto je známý také jako Acrp30, GBP28, a APM-1 [60–63]. Byly identifikovány jeho dva receptory, a to adiponectinový receptor 1 (ADIPOR1, OMIM 607945) a adiponectinový receptor 2 (ADIPOR2, OMIM 607946) [64]. I přes své nezvykle vysoké sérové koncentrace [mg/l] proti koncentracím obvyklým u jiných hormonů [μg/l] je tento adipokin považován za hormon [65,66]. Adiponectin je nejvíce zastoupeným

proteinem produkovaným tukovou tkání v plazmě a tvoří přibližně 0,01% všech plazmatických proteinů [67].

Obrázek 5. Schéma aktivit adipokinů (LEP, ASP, ADIPOQ), jejich účinky a regulace (Podle Havela [57]).

Leptin (LEP) působí inhibicí příjmu potravy a zvýšení energetického výdeje na úrovni CNS (patrně aktivací sympatiku). Kromě toho ovlivňuje i další neuroendokrinní funkce. Zvýšení inzulínové senzitivity účinkem leptinu je výsledkem jeho přímého působení na svalové buňky (zvýšení oxidace VMK stimulované aktivací AMP-kinázy (AMP-K) vede ke snížení intracelulárního (IC) obsahu lipidů) a nepřímého účinku zprostředkovaného CNS. Hlavní vliv na sekreci leptinu má změna v metabolismu glukózy (Glc) v adipocyty ovlivněná účinky postprandiálně uvolňovaného inzulínu. Syntézu leptinu snižují katecholaminy, tumor necrosis faktor α (TNF α) a deriváty thiazolonu. **ASP (acylation stimulating protein)** produkovaný z komplemetového faktoru 3 v adipocytech) je lokálním stimulantem importu glukózy do adipocyty, který pozitivně ovlivňuje aktivitu diacylglycerolacyltransferázy (DGAT), snižuje aktivitu hormon-senzitivní lipázy (HSL) a přispívá ke zvýšené syntéze a ukládání triacylglycerolů (TAG). ASP se pravděpodobně (on vitro studie) může podílet i na zvyšování sekrece inzulínu. Tvorba ASP zvyšuje inzulín a přítomnost chylomikér a VLDL. **Adiponectin (ADIPOQ)** zvyšuje inzulínovou senzitivitu, snižuje produkci glukózy v hepatocytech a přispívá ke snížení plasmatické hladiny glukózy. Tyto účinky zvyšující citlivost na působení inzulínu jsou zprostředkovány aktivací AMP-K, v jejímž důsledku dochází k zvýšení β -oxidace. Deriváty thiazolonu mohou zvýšit inzulínovou senzitivitu stimulací syntézy adiponectinu zprostředkovanou jejich účinky na stimulaci PPAR γ . Expresi a sekreci adiponectinu inhibují katecholaminy, glukokortikoidy, TNF α , interleukin-6 (IL-6), zvětšení velikosti adipocytů nebo jejich snížená inzulínová senzitivita.

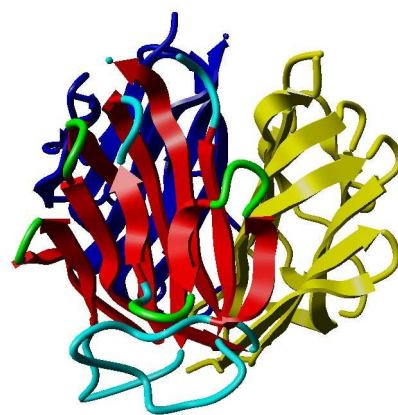


Gen pro adiponectin o velikosti 16kb se nachází na 3. chromozomu a je tvořen 3 exony a dvěma introny, obsahuje nekódující exon 1 a dlouhý první intron (přibližně 12kb) [58].

Kódující sekvence začíná na počátku exonu 2 a končí na 5'konci exonu 3.* Prekurzor pro adiponectin je tvořen 244 aminokyselinovými zbytky (AK) a vlastní maturovaný adiponectin je tvořen 230 AK (referenční sekvence mRNA GI:44890057). Adiponectin má na svém N-konci kolagen-like doménu (pozice 31-90 AK) a na C-konci (pozice 97-228 AK) doménu globulární (referenční sekvence proteinu GI:4757760). Adiponectin vykazuje strukturální homologii s kolageny VIII a X (kolagenní doménou) a s komplement faktorem C1q (kolagenní i globulární doménou) [68]. Adiponectin je proto [5]řazen do C1q rodiny [5, 69]. Byla ovšem popsána i jeho strukturální podobnost s TNF-alfa [3, 69, 70].

Obrázek 6. Struktura trimeru adiponectinu.

Kvarterní struktura globulární domény adiponectinu je blízce přítomná TNF- α . Obě molekuly se vyznačují antiparalelním uspořádáním β -skládaných listů centrální domény. Na obrázku není znázorněna kolagenu podobná část molekuly vycházející z N-koncové části. (Generováno pomocí programu Yasara Dynamics z pdb 1c28 (AA 113-245) na základě krystalografie dle Shapiro a Sherera [70])



Adiponectin se může v plazmě vyskytovat ve své nezkrácené formě nebo ve výrazně menší míře jako zkrácená forma globulární (obsahující pouze globulární doménu) [5]. Globulární forma adiponectinu je vytvářena proteolytickým štěpením adiponectinu leukocytární elastázou (ELA2, OMIM 130130), enzymem produkovaným aktivovanými monocyty a nebo neutrofily [71]. Význam této posttranslační modifikace adiponectinu *in vivo* není dosud popsán. Neštěpený adiponectin se v plazmě vyskytuje v podobě homotrimerů (Obr. 6), které mohou dále asociovat, a tvořit tak dimery až hexamery trimerů adiponectinu. Formování oligomerů závisí na tvorbě disulfidických můstků mezi Cys na pozici 39 proteinového řetězce adiponectinu [68]. *In vivo* existují tři dominantní formy multimerů adiponectinu – nízkomolekulární forma (LMW, low molecular weight) – homotrimer, forma o střední molekulové hmotnosti (MMW, middle-molecular weight) tvořená dvěma homotrimery

* Stejná organizace genu byla popsána i pro leptin, i když aminokyselinová sekvence již nevykazuje žádnou podobnost [58]

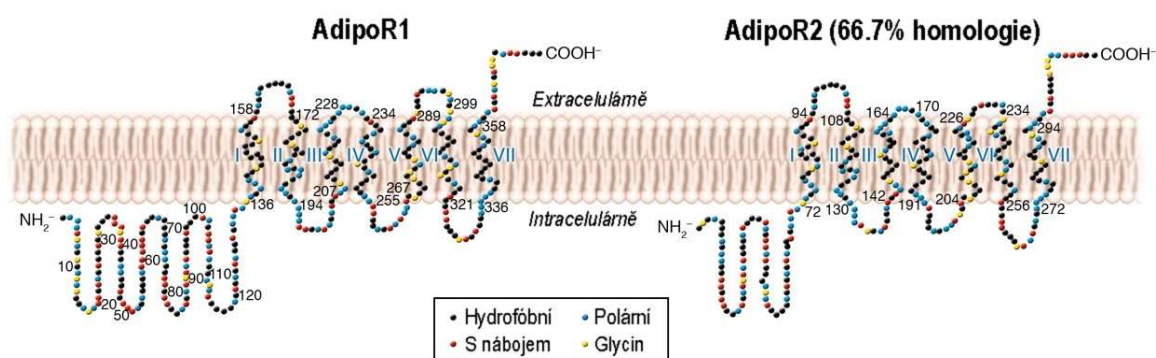
spojenými disulfidickým můstkem v kolagen-like doméně [72] a vysokomolekulární forma (HMW, high molecular weight) tvořená 4 až 6 homotrimery [68,73,74]. Poměr jednotlivých izoform adiponectinu má větší vliv na inzulínovou rezistenci, resp. senzitivitu vůči inzulínu, než absolutní sérové koncentrace adiponectinu [75]. Určení poměru HMW vůči celkovému adiponectinu se jeví jako vhodnější pro predikci rozvoje inzulínové rezistence a metabolického syndromu než samotné sérové koncentrace celkového adiponectinu [76].

Na myším modelu bylo v závislosti na pohlaví také popsáno rozdílné zastoupení jednotlivých izoform – u samic bylo zastoupení LMW a HMW forem adiponectinu relativně rovnoměrné, zatímco u samců se predominantně vyskytovala LMW izoforma [68].

1.3.1.2 Adiponectinové receptory

Adiponectin (nezkrácená i globulární forma) působí prostřednictvím svých dvou receptorů ADIPOR1 a ADIPOR2 (Obr. 7). ADIPOR1 preferenčně interaguje s globulární a ADIPOR2 s nezkrácenou formou adiponectinu [64]. Oba receptory se vyskytují ubikvitně, přičemž u myši je ADIPOR1 nejvíce přítomen ve svalových a ADIPOR2 v jaterních buňkách. [64]. Byla také popsána přítomnost adiponectinových receptorů v β -buňkách pankreatu, kdy byla jejich exprese regulována přítomností volných mastných kyselin [5]. Exprese ADIPOR2 v 3T3-L1 adipocytech je zvýšena za přítomnosti růstového hormonu [77].

Obrázek 7. Pravděpodobná organizace AdipoR1 a 2 v cytoplazmatické membráně [5]. Oba adiponectinové receptory (Obrázek XX.) obsahují 7 transmembránových domén s intracelulárně lokalizovaným N-koncem a extracelulárně se vyskytujícím C-koncem (což je obrácená topologie proti ostatním s G-proteiny asociujícím receptorům) [64]. Jsou z více než 66% navzájem homologní [64] a mohou tvořit jak homo- tak hetero-multimery.



1.3.1.3 Účinky adiponectinu, zejména ve vztahu k inzulínové senzitivitě

Na rozdíl od jiných adipokinů, jako např. TNF a resistin, které vyvolávají inzulínovou rezistenci, má adiponectin inzulín-senzitizující účinky [5, 74]. Kromě těchto účinků je mu přičítáno též působení antiaterogenní a protizánětlivé [78, 79] (Obr. 5, str. 23). Adiponectin prostřednictvím aktivace 5'-AMP-aktivované proteinové kinázy (AMPK) stimuluje utilizaci glukózy ve svalové buňce (obě formy adiponectinu) [80] a v hepatocytu (jen nezkrácená forma adiponectinu) [81] a paralelně s aktivací AMPK stimuluje adiponectin fosforylaci acetyl-koenzymA karboxylázy (ACC), oxidaci mastných kyselin, zvyšuje vstup glukózy do buněk a produkci laktátu, v hepatocytech navíc inhibuje enzymy zapojené do glukoneogeneze, čímž *in vivo* snižuje sérové koncentrace glukózy [81]. Z dosavadních výsledků se zdá, že adiponectin je také schopen zvýšit aktivitu receptorů PPAR- α . Na modelu buněk H4IIE hepatomu byl přidáním adiponectinu k těmto buňkám zcela bez přítomnosti inzulínu prokázán signifikantní pokles exprese klíčových enzymů glukoneogeneze (glukóza-6-fosfatázy a fosfoenolpyruvát karboxykinázy) [82] a současně byla pozorována snížená syntéza glukózy z laktátu a pyruvátu [82]. Bylo prokázáno, že účinky adiponectinu na zvýšení vstupu glukózy do buněk jsou independentní na účincích zprostředkovaných přes PI3K [81], která je hlavní postreceptorovou cestou regulace vstupu glukózy intracelulárně v případě inzulínového receptoru (Obr. 3, str. 10). Zvýšením oxidace mastných kyselin ve tkáních snižuje sérové koncentrace mastných kyselin a redukuje intracelulární obsah TAG v játrech a svalových buňkách [83]. Kromě těchto metabolických a inzulín-senzitizujících účinků navíc adiponectin snižuje expresi adhezivních molekul v buňkách cévního endotelu a také tlumí produkci cytokinů v makrofázích, čímž snižuje rozvoj zánětlivých procesů, které se vyskytují v časných fázích aterogenních změn [83].

1.3.1.4 Změny sérových koncentrací adiponectinu

Sérové koncentrace adiponectinu u zdravých mužů podléhají diurnálním rytmům s poklesem během noci (zejména po půlnoci) a návratem k normálním hodnotám časně ráno, s největším poklesem v průměru o 20% průměrné hodnoty (ze všech denních měření koncentrací adiponectinu) mezi 3. a 4. hodinou ráno [84]. Současně byla popsána závislost změn sérových koncentrací adiponectinu na diurnálních změnách v sérových koncentracích kortizolu, kdy byl pozorován fázový posun změn adiponectinémie proti kortizolu o +1 hodinu [84]. Závislost změn sérových koncentrací adiponectinu na hormonálních změnách v průběhu menstruačního cyklu nebyla dosud popsána. U dalšího adipokinu – leptinu – byly

tyto závislosti popsány [85, 86]. Hodnoty sérových koncentrací ADIPOQ jsou u lidí závislé na pohlaví, přičemž u žen jsou popisovány sérové koncentrace 2-3x vyšší než u mužů [60, 68, 87], s negativní korelací se sérovými koncentracemi androgenů [88, 89]. Sérové koncentrace adiponectinu podle většiny dostupných publikací u obou pohlaví negativně korelují s BMI (body mass indexem) a množstvím tukové tkáně [90–93]. Bylo pozorováno zvýšení adiponectinémie v průběhu hubnutí obézních [93]. Pokles sérových koncentrací adiponectinu se vyskytuje také specificky u obezity viscerální [94, 95].

Stejně jako u obézních jedinců jsou snížené sérové koncentrace adiponectinu pozorovány u osob s inzulínovou rezistencí, resp. s diabetem mellitem [91, 93, 96], a zvýšené koncentrace adiponectinu jsou považovány za nezávislý prediktor sníženého rizika rozvoje diabetu mellitu u dosud zdravých jedinců [96]. Na druhé straně v letošním roce publikovaná práce neprokazuje rozdíl sérových koncentrací adiponectinu mezi štíhlými a obézními jedinci ani jejich vztah k inzulínové senzitivitě [97].

Bylo prokázáno, že za euglykemických podmínek zvýšená inzulínémie výrazně redukuje sérové koncentrace adiponectinu [98].

Je ovšem nutné podotknout, že všechny práce hodnotící změny sérových koncentrací za různých fyziologických a nebo patologických podmínek hodnotily pouze koncentrace celkového adiponectinu, k jehož stanovení existují komerčně dostupné kity, a nikoliv koncentrace jeho jednotlivých izoform (LMW, MMW, HMW adiponectin), v jejichž parciálním zastoupení mohou existovat různé, dosud nepopsané změny.

1.3.1.5 Ovlivnění exprese adiponectinu

Sekrece adiponectinu z 3T3-L1 adipocytů vyžaduje aktivitu PI3K [99], jedné z hlavních molekul postreceptorové signalizace inzulínového receptoru. U pacientů s DM 2. typu je v adipocytech snížené množství inzulínovým receptorem aktivovaných IRS1 molekul asociovaných do komplexu s PI3K [100], což je považováno za možnou příčinu snížené sekrece adiponectinu z adipocytů a za příčinu poklesu jeho sérových koncentrací u diabetu mellitu 2. typu [3]. Snížení exprese mRNA pro adiponectin i pokles jeho sekrece z 3T3-L1 adipocytů bylo dosaženo přidáním IL-6 nebo TNF α [101], cytokinů, jejichž sérové koncentrace se zvyšují také při existujícím diabetu, ale také po stimulaci buněk inzulínem [102]. Na druhou stranu přidání růstového hormonu (GH), angiotensinu 2 ani trijodtyroninu k 3T3-L1 adipocytům expresi adiponectinu neovlivnilo [102]. V promotorové oblasti genu

pro ADIPOQ se vyskytuje sekvence glukokortikosteroidního receptor-responzibilního elementu [103]. Exprese adiponectinu se také *in vitro* snižuje po přidání dexametazonu [101]. Na druhou stranu aplikace prednizolonu sérové koncentrace ADIPOQ zvyšuje [87]. Snížení exprese ADIPOQ po β -adrenergní stimulaci cestou aktivace G(S)-protein-PKA dependentní dráhy [104] ukazuje na jeho možnou úlohu v rozvoji katecholaminy indukované inzulínové rezistence [105].

1.3.2 Leptin

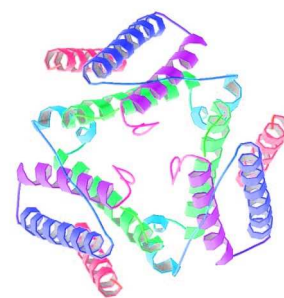
1.3.2.1 *Struktura a uspořádání leptinu*

Leptin (LEP, OMIM 164160) je prvním adipokinem [2] objeveným v roce 1994. Jedná se o proteinový hormon o velikosti 16kDa, který svými centrálními účinky vyvolává pocit sytosti a snižuje váhový přírůstek ovlivněním exprese anorexigenních (zvýšení exprese) a orexigenních (snížení exprese) peptidů v hypotalamu [106] a mozkovém kmeni [107], a také periferními účinky na lipogenezu a oxidaci mastných kyselin [108]. Leptin je produkován nejen diferencovanými adipocyty, ale také placentou [109]. Účinky leptinu zasahují řadu biologických aktivit od inhibice sekrece inzulínu v β -buňkách, přes stimulaci transportu sacharidů a aktivaci krevních destiček a regulaci homeostázy FFA [110].

Gen pro leptin o velikosti 4,5kb se nachází na 7 chromozomu a je stejně jako gen pro adiponectin tvořen 3 exony a 2 introny [2,58]. Prekurzor pro leptin je tvořen 167 aminokyselinovými zbytky a vlastní maturovaný leptin tvoří 146 AK (referenční sekvence mRNA GI:4557714). Podle výsledků krystalografických studií může i leptin tvořit trimery (Obr. 8.). V krevním oběhu existuje rovnováha mezi leptinem vázaným na solubilní leptinový receptor (viz dále) a volnou, biologicky aktivní formou [111]. Ke zvýšení frakce vázaného leptinu dochází při obezitě, těhotenství a mutacích leptinových receptorů [112].

Obrázek 8. *Kvarterní struktura trimeru leptinu.*

Monomerní podjednotka se skládá ze shluku čtyř α -helixů. Prostorová organizace molekuly je příbuzná členům cytokinové rodiny 14 s helikálně uspořádaným dlouhým polypeptidovým řetězcem. (www.pdb.org z 1ax8 na základě krystalografie dle Zhanga [113])



1.3.2.2 Leptinový receptor

Leptinový receptor (LEPR, OB-R, OMIM 601007) byl identifikován o rok později [56]. Jedná se o transmembránový receptor s jednou transmembránovou doménou, patřící do rodiny třídy I cytokinových receptorů, které mají charakteristicky extracelulárně přítomnou pro cytokinové receptory homologní doménu [112] a nemají vlastní kinázovou aktivitu. Sekvence LEPR vykazuje vysokou podobnost například s receptory pro IL-6 a GCSF (glynulocyte-colony stimulating factor) [112]. Dosud bylo identifikováno 6 jeho sestříhových variant (LEPR a-f). LEPR izoformy mají podobnou extracelulární ligand-vážíci doménu na svém N-konci, ale odlišují se svým intracelulárně lokalizovaným C-koncem [112]. 5 izoform LEPR obsahuje transmembránovou doménu, ale pouze tzv. dlouhá forma leptinového receptoru (LEPRb) má zachované intracelulární motivy nezbytné pro aktivaci JAK-STAT signálně transdukční cesty zprostředkovávající hlavní směr přenosu signálu z leptinového receptoru. Jedna varianta (LEPR_e, sOB-R) neobsahuje žádnou transmembránovou ani intracelulární doménu a bývá označován jako solubilní leptinový receptor [112]. Vyskytuje se v plazmě, resp. v séru, a tvoří hlavní vazebný protein pro cirkulující leptin. Jsou popsány změny jeho sérových koncentrací v závislosti na pohlaví (muži mají vyšší koncentrace sOB-R než ženy) a celkovém množství tuku v organismu u obou pohlaví (negativní závislost), a také pozitivní korelace se sérovými koncentracemi estradiolu [114].

1.3.2.3 Účinky leptinu

Stejně jako u ostatních cytokinových receptorů třídy I (např. receptory pro IL-6, GH nebo prolaktin) je signál po aktivaci receptoru vazbou s leptinem přenášen prostřednictvím JAK-STAT signálně transdukční cesty [112]. JAK kinázy trvale asociují s intracelulárními doménami LEPRb. Interakce leptinu s LEPRb vyvolá autofosforylaci asociovaných JAK proteinů (u lidí JAK2) [111], následovanou fosforylací tyrosinových zbytků na pozici 985 a 1138 intracelulární domény LEPRb a fosforylací transkripčního faktoru STAT3 [111].*

Kromě dominantní JAK/STAT signalizace reguluje leptinem aktivovaný LEPRb dobře známé molekuly zapojené do signálně transdukční dráhy inzulínového receptoru – IRS1, MAP

* Tyto signální molekuly jsou hojně exprimovány v hypotalamu, mozkovém kmeni a dalších částech mozku odpovědných za regulaci příjmu potravy, autonomních a neuroendokrinních funkcí [112].

kinázu, ERK, AKT, AMP kinázu a PI3K, což posiluje názor, že leptin a inzulín spolupracují při kontrole energetického metabolismu [115,116]. Účinky leptinu na snížení příjmu potravy jsou zprostředkovány aktivací PI3K v CNS [57]. Tato cesta tak ukazuje možnost synergního působení inzulínu a leptinu jako produktů periferních tkání na CNS v hypotalamické regulaci příjmu potravy a energetického metabolismu [115–117]. Aktivovaný LEPRb je také schopen fosforylovat SH2 doménu SHC proteinu, který asociuje s Grb2 adaptorovým proteinem, a tento komplex aktivuje RAS protein – což je kritický krok při regulaci buněčné proliferace a diferenciaci [112, 115] (Obr. 3, str. 10).

Jiné práce připisují některé metabolické účinky leptinu, zejména jeho ovlivnění metabolismu tuků v játrech, jeho působení prostřednictvím inhibice steroyl-CoA desaturázy [118], čímž má zprostředkovávat úbytek tělesné hmotnosti.

Cílovými molekulami, jejichž expresi leptin v CNS ovlivňuje jsou neuropeptidy. Jednu skupinu tvoří tzv. orexigenní peptidy, které podporují chuť k jídlu a zvyšování tělesné hmotnosti – například neuropeptid Y (NPY), tzv. agouti-related peptid (AgRP) nebo melanin-concentrating hormon (MCH), jejichž exprese je leptinem snižována. Druhou skupinu tvoří tzv. anorexigenní peptidy, které snižují chuť k jídlu a tělesnou hmotnost. Mezi tyto neuropeptidy patří například proopiomelanokortikotropní hormon (POMC, proopiomelanocortin), kortikotropin-releasing hormon, tyrotropin-releasing hormon a kokain- a amfetamin-regulující transkript (CART) [111].

1.3.2.4 Ovlivnění exprese leptinu a jeho sérových koncentrací

U leptinu stejně jako u adiponektinu byly popsány diurnální rytmy [84], a také byla popsána závislost změn plazmatických koncentrací leptinu na menstruačním cyklu [85], později bylo upřesněno, že tato závislost se týká volného leptinu, nikoliv leptinu vázaného ani solubilního leptinového receptoru (LEPR_e) [86].

Výsledky studií sledující přímé účinky leptinu na inzulínovou senzitivitu v inzulín-dependentních tkáních, jako jsou játra, svaly a tuk, nebyly zcela jednotné, přesto byl přijat všeobecně akceptovaný názor, že exprese i sekrece leptinu se zvyšuje při obezitě a že existuje silná korelace mezi sérovými koncentracemi leptinu a celkovými zásobami tukové tkáně v organizmu [106, 119]. V souladu s chutí k jídlu tlumícími účinky leptinu je jeho exprese stimulována při jídle a inhibována v období hladovění [120]. Koncentrace leptinu v bílé tukové tkáni a plazmě pozitivně koreluje nejen s množstvím tukové tkáně, ale také s velikostí

adipocytů a množstvím v nich obsažených TAG [111]. V souvislosti s popsány anorexigenními účinky leptinu je obtížně vysvětlitelné, proč obézní jedinci, i když mají výrazně zvýšené sérové koncentrace leptinu proti štíhlým jedincům, nemají tlumenu chuť na jídlo. Tato „paradoxní“ situace je vysvětlována rozvojem leptinové rezistence [121], při které na krysích modelech s hyperkalorickou dietou indukovanou obezitou a hyperleptinemií aplikace exogenního leptinu nevyvolá adekvátní účinky v CNS. [121] Sérové koncentrace leptinu jsou také po korekci podle BMI vyšší u žen než u mužů. Příčinou sexuálního dimorfizmu je mimo jiné vyšší produkce leptinu v subkutánní tukové tkáni u žen, inhibice exprese androgeny a stimulace estrogyeny [122]. Sérové koncentrace leptinu jsou dále zvýšeny působením inzulínu, glukokortikoidů a cytokinů, např. TNF α a IL-6, a naopak sníženy při androgenní stimulaci nebo působení chladu [106]. Přesné signály a mechanismy regulace exprese leptinu ovšem nejsou dosud zcela známy [111]. Bylo identifikováno, že v krysích adipocytech reguluje syntézu leptinu a jeho uvolňování orexigenní neuropeptid melanin-concentrating hormon (MCH) [123, 124].

1.3.3 Resistin

1.3.3.1 *Struktura a uspořádání resistinu*

Resistin [RETN, FIZZ3 (found in inflammatory zone), OMIM 605565] je proteinový hormon tukové tkáně o velikosti 12,5kDa [125], který byl z trojice adiponectin, leptin, resistin objeven nejpozději, až v roce 2001 [126], a jeho receptory nebyly identifikovány dodnes.

Gen pro resistin o velikosti 1,75kb je lokalizován na 19. chromozomu a je tvořen 4 exony, z nichž 3 kódují peptid o délce 114 AA zbytků. Na svém C-konci má resistin unikátní motiv obsahující 11 cysteinových zbytků [126]. Cysteinová repetice umožňuje oligomerizaci resistinových monomerů [127].* Bylo popsáno, že mutace v resistinu Cys26Ala způsobuje ztrátu schopnosti multimerizace [127].

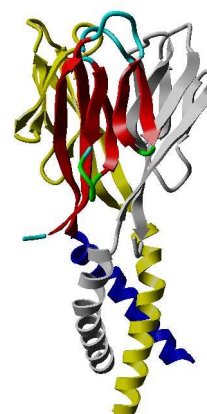
Kromě resistinu existuje také skupina tzv. resistinu podobných molekul (RELM, resistin-like molecules), u člověka byla identifikována RELM β (OMIM 605645), která má na svém C-konci podobný motiv jako resistin a je také schopna oligomerizovat [128]. Na základě

* Podobné motivy se vyskytují i u secernovaných růstových faktorů [127]

získaných výsledků se od r. 2002 začalo předpokládat, že molekuly resistinu jsou schopny tvořit vyšší struktury, a to jak homo- tak hetero-oligomery i s resistin-like molekulami [129] a v roce 2004 byly publikovány výsledky krystalografických studií resistinu (Obr. 9) [130]. Známý vliv tvorby různě velkých proteinových komplexů u adiponectinu s přímým vlivem na jeho biologickou účinnost a ovlivnění inzulínové senzitivity implikuje i u resistinu možnost regulace účinků resistinu na inzulínovou rezistenci pomocí různě biologicky aktivních oligomerů.

Obrázek 9. Struktura trimeru resistinu.

Každý monomer se skládá z „hlavy“ – domény β -sendvičové struktury navzájem spojené disulfidickými můstky na karboxylovém konci a „ocas“ – α -helikální domény na aminokonci proteinu. (Generováno pomocí programu Yasara Dynamics z pdb 1rfx (AA 16-94) na základě krystalografie dle Patela [130])



1.3.3.2 Účinky resistinu

Resistin v pankreatických β buňkách inhibuje expresi inzulínového receptoru, ale neovlivňuje expresi inzulínu [131]. Na myším modelu s absencí resistinu dochází k snížení lačné glykémie v důsledku poklesu glukoneogeneze v hepatocytech, což může být částečně zprostředkováno aktivací AMP-aktivované proteinové kinázy a snížením exprese enzymů zapojených v hepatální glukoneogenezi. Z těchto dat se předpokládá fyziologická funkce resistinu na udržování glykémie při lačnění a hladovění [132]. Kultivované adipocyty vystavené účinkům resistinu měly sníženou schopnost intracelulárního transportu glukózy po stimulaci inzulínem, zatímco aplikace protilátek proti resistinu měla opačný účinek [133].

1.3.3.3 Ovlivnění exprese a sérových koncentrací resistinu

Expresie resistinu je indukována během zrání adipocytu, a ve zralém adipocytu je inhibována po přidání aktivátorů PPAR γ (TZD), které *in vivo* zlepšují inzulínovou senzitivitu. Míra exprese resistinu tukovou tkání je podobná mezi abdominálním subkutánním a viscerálním tukem, ale například ve stehenní s.c. tukové tkáni je více než 4x nižší proti tkáni lokalizované abdominálně [134]. Byl vysloven předpoklad, že právě zvýšení exprese resistinu tukovou

tkání v abdominální oblasti je příčinou rozvoje DM 2. typu u jedinců s centrálním typem obezity [134]. Na druhou stranu je exprese resistinu negativně regulována TNF α [135], který je jedním z markerů probíhajícího chronického subklinického zánětu u DM 2. typu. Sérové koncentrace resistinu jsou zvýšené u obézních proti štíhlým jedincům [126] i u jedinců s DM 2. typu [1]

1.3.4 TNF α

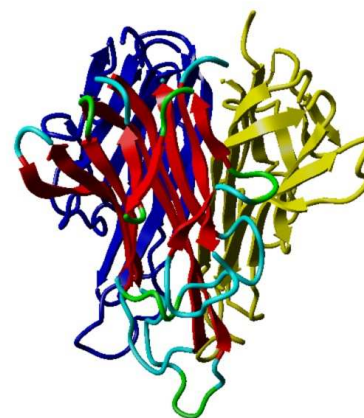
Významnou signální molekulou s velmi širokým spektrem biologických účinků je TNF α (tumor necrosis factor – alpha, TNF, TNFA, OMIM 191160), který je díky podílu na regulaci lipidového metabolismu [136] a produkci v adipocytech řazen mezi adipokiny [137]. TNF α je považován za prozánětlivý cytokin, který se také účastní na rozvoji inzulínové rezistence [138]. Porucha regulace TNF byla popsána v souvislosti s patogenezí řady onemocnění včetně sepse, mozkové malárie, diabetu, nádorových onemocnění, osteoporózy, rejekce transplantátu a autoimunitních chorob (roztroušená skleróza, revmatoidní artritida apod.) [139].

1.3.4.1 *Struktura TNF α a jeho receptory*

Gen pro TNF je lokalizován na 6. chromozomu. TNF je syntetizován jako transmembránový prohormon o velikosti 26kDa. Vlastní solubilní molekula TNF o velikosti 17kDa (157 aminokyselin) je z něj uvolněna proteolytickým štěpením tzv. TNF α konvertujícího enzymu (TACE) [1, 136]. TNF je homotrimer (Obr. 10) primárně uvolňovaný aktivovanými makrofágy, avšak schopnost jeho produkce mají i další buňky, včetně adipocytů.

Obrázek 10. *Struktura trimeru TNF α .*

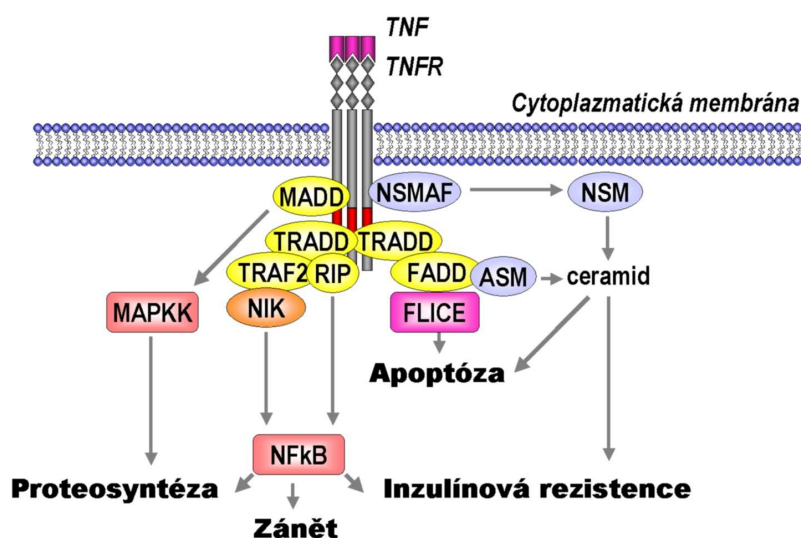
Kvarterní struktura myšního TNF α s antiparalelním uspořádáním β -skládaných listů centrální domény vytvářející globulární útvar připomínající trojboký jehlan. Na obrázku není znázorněna kolagenu podobná část molekuly vycházející z N-koncové části. (Generováno pomocí programu Yasara Dynamics z pdb 1c28 (AA 9-157) na základě krystalografie dle Baeyens et al. [140])



Solubilní TNF je schopen interagovat se svými dvěma receptory TNFR1 (OMIM 191190) a TNFR2 (OMIM 191191), o velikostech 60kDa, resp. 80kDa, které jsou exprimovány ubikvitně, i když v odlišných poměrech specificky pro různé tkáně.

Receptory pro TNF tvoří skupinu transmembránových proteinů, jejíž členové (CD95/Apo1/FasR, DR2, DR3 a další) slouží jako primární regulátory apoptózy se schopností ovlivňovat i řadu dalších buněčných funkcí (proliferaci, imunitní odpověď, růst a diferenciaci či reakci na stresogenní podněty) [141]. Tato signální rozmanitost je dána množstvím adaptorových molekul, které jsou schopny interagovat s aktivovanými receptory v různých typech buněk. Po vazbě ligandu dochází u skupiny TNFR k homotrimerizaci indukující sterické změny intracytoplazmatické části receptoru obsahující DD (death domain) motiv. DD vytváří platformu pro asociaci dalších adaptorových molekul, jejichž kvalita a kvantita rozhoduje o výsledném charakteru signální transdukce (Obr. 11).

Obrázek 11. Schéma hlavních signálně-transdukčních drah aktivovaného TNF receptoru (TNFR). Vazba TNFR s FADD (Fas-associated death domain) obsahujícím DED (death effector domain) motiv vede k přímé aktivaci proximální prokaspázy (FLICE; prokaspáza-8) iniciující intrinsickou cestu apoptózy. Na aktivaci apoptózy se rovněž podílí aktivita kyselé a neutrální sfingomyelinázy (ASM a NSM) odštěpující ceramid ze sfingomyelinu vnitřního listu cytoplazmatické membrány. Bylo prokázáno, že sfingomyelin se podílí na inhibici exprese GLUT4 v adipocytech [142]. Asociace TNFR s TRADD (TNFR-associated death domain), umožňující navázání RIP (receptor-interacting protein) a TRAF2 (TNFR-associated factor 2) směřuje k aktivaci NFκB (nukleárního faktoru κB), jež ve většině buněk má spíše antiapoptotické působení a vede k rozvoji zánětlivých a následných metabolických změn.

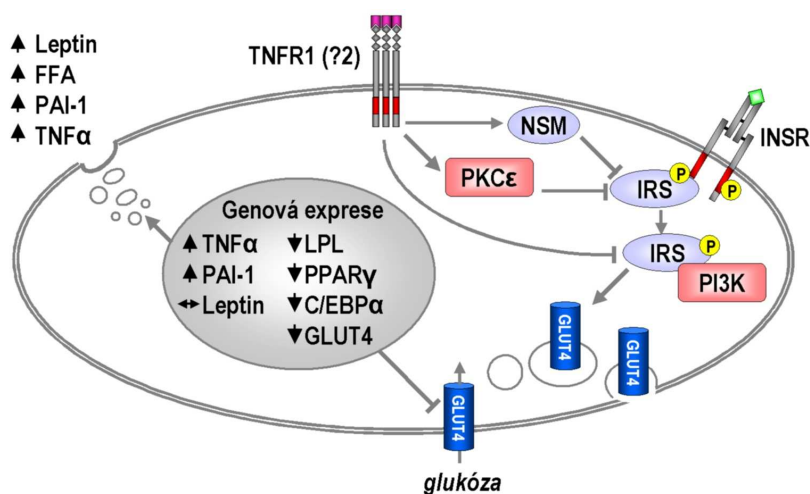


Po interakci TNF s receptorem může dojít k proteolytickému oddělení extracelulární části receptoru a vzniknou tzv. solubilní formy obou receptorů (sTNFR1, sTNFR2) [136, 143]. Solubilní TNFR1 váže TNF, a snižuje tak jeho biologickou dostupnost [143]. Mezi sérovými koncentracemi solubilních forem obou receptorů u zdravých jedinců a pacientů s DM 2. typu nebyly zjištěny významné rozdíly, ale v obou skupinách pozitivně korelovaly s věkem, navíc u pacientů s DM 2. typu korelovaly pozitivně koncentrace sTNFR1 a sTNFR2 se sérovými koncentracemi leptinu [144]. Následně provedené studie ovšem prokázala negativní korelaci mezi sérovými koncentracemi sTNFR2 a inzulínovou senzitivitou [143].

1.3.4.2 *Vliv TNF α na rozvoj inzulínové rezistence a na metabolismus adipocytů*

TNF je silný negativní regulátor diferenciaci adipocytů [145]. *In vitro* TNF indukují fosforylaci serinového zbytku IRS1, a takto fosforylovaný IRS1 působí jako inhibitor tyrosinkinázové aktivity aktivovaného inzulínového receptoru a také následných postreceptorových signálů, včetně PI3K (Obr. 12) [119].

Obrázek 12. *Možný mechanismus vzniku inzulínové rezistence účinkem chronické stimulace TNF α v adipocytu [136]. TNF α vykazuje negativní účinky na aktivaci INSR především na úrovni aktivace a signalizace IRS. Účinkem TNF α dochází ke změně ve fosforylaci IRS, která způsobuje jeho nedostatečnou interakci s PI3K (pravděpodobně účinkem mediovaným izoformami PKC, nebo NSM). Výsledkem je inhibice translokace GLUT4 do cytoplazmatické membrány s následným snížením intracelulárního transportu glukózy. K ní přispívá i inhibice exprese GLUT4 genu v důsledku působení TNF α [142]. TNF α stimuluje produkci volných mastných kyselin (FFA) v adipocytu a zvyšuje expresi leptinu, čímž se podílí na prohlubování inzulínové rezistence v adipocytech. Inhibiční transkripčních faktorů skupiny C/EBP (CCAAT enhancer-binding proteins) a PPAR γ působí negativně na diferenciaci adipocytů z preadipocytů.*



Tato aktivita TNF je pravděpodobně mediována aktivací NF κ B (resp. inaktivací I κ B), avšak může se na ní podílet i signalizace zahrnující aktivaci p44/p42 MAPK [146]. TNF downreguluje IRS1 a GLUT4 a je navíc schopen indukovat lipolýzu [147]. Úloha prostřednictvím TNF fosforylovaného IRS2 na inhibici inzulínového receptoru, stejně jako signálně transdukční cesta těchto fosforylací, není dosud objasněna [148]. Neutralizace TNF na modelových zvířatech vedla ke zlepšení inzulínové senzitivity [119]. Na zvířecích modelech bylo prokázáno zvýšení exprese TNF v adipocytech při obezitě a při na lipidy bohaté dietě [137].

U lidí je exprese TNF v adipocytech proti experimentálním zvířatům nižší, ale také pozitivně koreluje s množstvím tukové tkáně [149] a snižuje se poté, co obézní jedinci zhubnou [119], ale jeho sérové koncentrace se po korelaci podle BMI neliší mezi inzulín senzitivními a rezistentními jedinci [150]. Sekrece TNF je také zvýšena po β -adrenergní stimulaci – tento efekt by mohl být zprostředkován aktivací lipolýzy, protože volné mastné kyseliny (FFA) jsou silnými stimulatory exprese TNF- α v tukové tkáni. Myši, kterým chybí protein aP2 (vazebný protein pro FFA) nejsou schopny v bílé tukové tkáni exprimovat TNF [119]. Práce studující možné ovlivnění exprese TNF prostřednictvím kortikoidů však dokládají rozporuplné výsledky [119]. Také jsou práce podporující názor, že za negativní regulátor jak exprese, tak sérových koncentrací TNF lze považovat růstový hormon [119].

1.3.5 Další adipokiny

PAI1 (plasminogen activator inhibitor 1, OMIM 173360) je jednou z nejdůležitějších komponent fibrinolytického systému. Hlavní funkcí PAI1 v hemostatické kaskádě je inhibice tkáňového aktivátoru plazminogenu, působí tedy ve výsledku prokoagulačně [1]. Zdrojem PAI1 jsou hepatocyty, endotelové buňky a také adipocyty, zejména ve viscerální tukové tkáni [1]. Zvýšené sérové koncentrace PAI1 jsou pozorovány u obézních a po redukci tukové tkáně dochází k jejich snížení. V experimentu bylo pozorováno zvýšení exprese mRNA pro PAI1 i jeho sekrece po stimulaci endotelových buněk inzulínem a FFA. Také byla pozorována pozitivní korelace mezi sérovými koncentracemi PAI1 a mírou steatózy jater, ovšem v tomto případě nelze jasně určit, zda je elevace PAI1 příčinou nebo důsledkem tohoto stavu [1]. Exprese PAI1 v 3T3-L1 adipocytech byla výrazně zvýšena po stimulaci IL-6 a růstovým hormonem [151].

ASP (acylation stimulating protein, C3a-des-Arg) je adipocyty derivovaný produkt proteolytického štěpení a následné modifikace komplement faktoru 3 (C3, OMIM 120700) [57]. Spolu s dalšími faktory – faktorem B a adipsinem (CFD, komplement faktor D, OMIM 134350) se C3 podílí na aktivaci alternativní cesty komplementového systému [1]. ASP působí hlavně parakrinně v tukové tkáni, i když tyto lokální regulace mají dopad na energetický metabolismus celého organismu. Jeho hlavní fyziologickou funkcí je zvýšení syntézy TAG v adipocytech, ve kterých stimuluje vstup glukózy a FFA do buněk, zvyšuje aktivitu diacylglycerolacyltransferázy (DGAT) a inhibuje aktivitu hormon senzitivní lipázy (HSL) [1, 57]. Cirkulující koncentrace ASP jsou pozitivně ovlivňovány množstvím tukové tkáně v organismu a klesají při hladovění a po úbytku hmotnosti. ASP uvolněné do venózní krve z adipocytů může být detekováno za 4-5 hodin po jídle [57]. ASP je schopen stimulovat expresi inzulínu v pankreatu [152]. Exprese ASP v adipocytech je v *in vitro* studiích stimulována inzulínem, ale také cirkulující lipidy (chylomikra) po jídle bohatém na lipidy jsou schopny zvýšit expresi ASP [57]

1.4 Změny adipokinů v těhotenství a při gestačním diabetu mellitu

Na změnách inzulínové senzitivity v těhotenství se výraznou měrou podílí orgán, který se mimo graviditu v organismu nevyskytuje, tedy placenta (*viz Odd. 1.4.1.1 Placenta jako endokrinní orgán*), a dále se předpokládá též podíl tkáně tukové, jejíž množství se v těhotenství proti stavu před ním zvyšuje. I v normálně probíhající graviditě přibere štíhlá těhotná celkem v průměru 12,5kg (rozmezí 9 až 15kg), z toho tuková tkáň tvoří přibližně 3kg [25], přičemž nežádoucí je váhový přírůstek těhotné ještě vyšší.

V důsledku mohutných hormonálních, metabolických i konstitučních změn existujících v těhotenství byly popsány i u zcela fyziologických gravidit změny adipokinů (zejména jejich sérových koncentrací) proti stavu mimo těhotenství. Sérové koncentrace adiponectinu při fyziologickém těhotenství korelují stejně jako ve stavu mimo graviditu negativně s BMI, přičemž bylo popsáno postupné mírné zvyšování koncentrací adiponectinu v prvním trimestru gestace, a potom jejich pokles, s minimálními koncentracemi ADIPOQ v době porodu [153]. Byla také provedena longitudinální studie na souboru mladých štíhlých žen, u kterých byly prekoncepčně, a potom na konci 1. a 3. trimestru těhotenství odebrány vzorky subkutánní tukové tkáně a periferní žilní krve. Bylo zjištěno, že ve 3. trimestru těhotenství

dochází ke poklesu sérových koncentrací adiponektinu, které je provázeno 2,5-násobným poklesem genové exprese ADIPOQ v s.c. tuku (hodnoceno na úrovni mRNA) proti hodnotám před těhotenstvím, a tyto změny byly spojeny s 25% nárůstem masy tukové tkáně [154]. V další práci publikované v letošním roce byly ovšem prezentovány výsledky rozdílné - tedy žádný signifikantní rozdíl mezi sérovými koncentracemi ADIPOQ u žen netěhotných a na konci 3. trimestru [155]. Signifikantní pokles sérových koncentrací adiponektinu byl v celém období těhotenství pozorován u těhotných s GDM [156] v době diagnózy, i u žen s GDM léčeným inzulínem proti zdravým kontrolám, přičemž léčba inzulínem na sérové koncentrace ADIPOQ neměla signifikantní vliv [157]

Také u dalšího adipokinu – resistinu – jsou v souvislosti s těhotenstvím popsány změny. Jeho sérové koncentrace se proti stavu mimo těhotenství zvyšují, ale nebyly pozorovány změny v sérových koncentracích u žen s GDM proti zdravým těhotným kontrolám se stejnou délkou gestace [155].

Sérové koncentrace leptinu jsou v těhotenství vyšší proti stavu před graviditou [158] a ve fyziologickém těhotenství pozitivně korelují s BMI [159]. Koncentrace LEP negativně korelují s mírou inzulínové senzitivity, tedy čím vyšší je inzulínová rezistence (např. při GDM), tím vyšší jsou sérové koncentrace LEP [160].

Také u TNF α byl popsán nárůst jeho sérových koncentrací na konci těhotenství proti stavu před těhotenstvím [161] a na konci gravidity TNF α negativně koreloval s mírou inzulínové senzitivity [162] a byl autory považován za vhodný prediktor inzulínové senzitivity u těhotných.

Ve vztahu k těhotenství fyziologickému i komplikovanému různými patologickými stavy byly dosud poměrně často, i když nezřídka rozporuplně, popsány změny sérových koncentrací hlavních adipokinů, v menší míře byly popsány změny jejich exprese na úrovni mRNA v tukových tkáních a placentě. Stále nezodpovězenou otázkou však zůstává, zda jsou tyto změny důsledkem či alespoň dílčí příčinou rozvoje inzulínové rezistence ve fyziologicky probíhajícím těhotenství i v těhotenstvích komplikovaných.

2 CÍL PRÁCE

Primárním cílem studie byla charakterizace změn genové exprese v subkutánní a viscerální tukové tkáni a placentě u žen s GDM. Pokusili jsme se charakterizovat změny genů angažovaných v inzulínové signalizaci regulující energetický mechanismus. Naše úsilí jsme zaměřili na hodnocení úlohy adipokinů, kterými se skupina Doc. MUDr. Haluzíka, CSc., školitele konzultanta, dlouhodobě zabývá.

- Charakterizace změn sérových koncentrací adiponectinu v průběhu menstruačního cyklu u mladých zdravých žen a možné ovlivnění těchto změn měnicími se sérovými koncentracemi hormonů zúčastněných v regulaci menstruačního cyklu (LH, FSH, estradiol a progesteron).
- Charakterizace expresních změn na úrovni mRNA v subkutánní a viscerální tukové tkáni a v placentě u těhotných s fyziologickým průběhem gravidity a s graviditou komplikovanou gestačním diabetem mellitem (GDM) u klasických adipokinů i u genů s dosud ne zcela jasným etiopatogenetickým vztahem k rozvoji inzulínové rezistence.
- Snaha o identifikaci nových markerů odlišných u žen s GDM, jako modelem časné fáze rozvoje inzulínové rezistence, proti zdravým těhotným.

3 METODY

3.1 Strategie řešení

Pro hodnocení vlivu adiponectinu jsme před vlastní studií považovali za důležité zodpovědět otázku, zda sérové koncentrace (exprese) adiponectinu jsou ovlivňovány změnami koncentrací pohlavních hormonů? K tomuto jsme přistoupili studií na zdravých dobrovolnicích analyzující koncentraci adiponectinu v séru odebíraném po 24h v rámci celého menstruačního cyklu.

Ve vlastní následné studii jsme k hodnocení změn genové exprese použili na začátku omezený vzorek pěti žen s GDM a tří kontrol, na kterém jsme provedli vyšetření pomocí expresního arraye zaměřeného na inzulínovou signalizaci. Expresní arrays umožňují vyšetření rozsáhlého souboru genů (112 genů) zapojených v regulaci signální cesty inzulínového receptoru v krátkém čase. Signifikantně změněné geny v arrayích a vybrané, dlouhodobě studované, geny (adipokiny a jejich receptory), byly vyšetřeny následně v celé analyzované populaci těhotných kontrol a pacientek s GDM pomocí qPCR. Tato analýza se ve srovnání s arrayemi vyznačuje vyšší přesností a řádově vyšším dynamickým rozsahem zachycení změn genové exprese.

Současně se změnami exprese byly ve vzorcích periferní maternální a pupečnickové krve studovaných subjektů stanoveny koncentrace cirkulujících adipokinů. V maternální krvi byly navíc stanoveny biochemické parametry pro posouzení inzulínové senzitivity a sérové koncentrace dalších signálních proteinů, případně jejich vazebných partnerů, jejichž genová exprese ve vyšetřovaných tkáních byla signifikantně změněna u GDM.

Výsledky změn genové exprese byly korelovány s vyšetřením sérových koncentrací vybraných adipokinů a korelovány s markery rozvoje GDM.

3.2 Charakterizace sérových koncentrací adiponectinu v závislosti na menstruačním cyklu

3.2.1 Vlastnosti vyšetřovaného souboru

Do studie bylo zařazeno 6 zdravých žen (věk $27,17 \pm 5,19$ roků; BMI $23,44 \pm 2,71$ kg.m⁻²) s fyziologickým průběhem i délkou menstruačního cyklu (28 ± 1 den), které po dobu minimálně posledních šesti měsíců před zahájením sledování nežívaly žádnou formu hormonální antikoncepce. První den studie byla od každé probandky získána základní klinická data a byly vyšetřeny relevantní biochemické parametry (Tab. 3)

Tabulka 3. Základní antropometrické charakteristiky a sérové koncentrace sledovaných parametrů vyšetřovaných žen získané v prvním dni menstruačního cyklu.

Parametr	Subjekt číslo					
	1	2	3	4	5	6
Věk [roky]	36	25	28	27	20	27
Výška [m]	1,65	1,75	1,74	1,82	1,58	1,70
Hmotnost [kg]	67	76	60	67	62	76
BMI [kg.m ⁻²]	24,6	24,8	19,8	20,2	24,8	26,3

3.2.2 Odběr a zpracování vzorků periferní žilní krve

Vzorky srážlivé periferní žilní krve byly po dobu 1 měsíce nabírány denně mezi 7:30 a 8:30 hod po nočním lačnění. Vzorky byly od doby odběru do separace séra uchovány v temnu při pokojové teplotě. Po vytvoření koagula bylo sérum separováno centrifugací (4000 ot./min), rozpipetováno na alikvotní objemy a do dalšího použití skladováno při -80°C .

3.2.3 Stanovení adiponectinu, hormonů charakterizujících menstruační cyklus a biochemických markerů diabetu mellitu

Sérové koncentrace adiponectinu byly měřeny ve dvojicích komerčně dostupným ELISA kitem (Human Adiponectin ELISA kit, Linco Research, USA). Na Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN u všech vzorků byly rutinními biochemickými metodami zjištěny sérové koncentrace LH, FSH, estradiolu a progesteronu umožňující přesné stanovení jednotlivých fází menstruačního cyklu a další biochemické parametry zjišťované v rámci vstupního vyšetření (sérové koncentrace glukózy, inzulínu, testosteronu, prolaktinu, kortizolu, celkového, HDL i LDL cholesterolu, triacylglycerolů a hodnota aterogenního indexu). Podrobnosti k jednotlivým metodám jsou uvedeny na stránkách ÚKBLD <http://ukb.lf1.cuni.cz>.

3.2.4 Statistické zpracování výsledků

Získaná data byla vyhodnocena statistickými programy S.A.S. (Statistical Analysis Software) verze 8.02 a STATISTICA98 Edition software (StatSoft Inc., Tulsa, OK) ve spolupráci s biostatistikem. U všech denně měřených parametrů (adiponectin, E2, PRG, LH, FSH) byl před hodnocením stanoven klouzavý průměr z 5-ti hodnot. Pro analýzu korelací sérových koncentrací adiponectinu a vstupních klinických i biochemických parametrů byl použit Spearmanův korelační test. Pro hodnocení vztahu mezi adiponectinem a denně měřenými pohlavními hormony byla použita cross-korelační analýza.

3.3 Charakterizace expresního profilu tukové tkáně a placenty ve vztahu ke GDM

3.3.1 Vlastnosti vyšetřovaného souboru

Do této části studie bylo zařazeno 27 těhotných s jednočetným těhotenstvím, které rodily plánovaným císařským řezem v termínu porodu (délka těhotenství 40 ± 2 týdny). Z nich bylo 13 zdravých žen s fyziologickým průběhem těhotenství a 14 žen s těhotenstvím komplikovaným gestačním diabetem mellitem (GDM), z toho 5 s GDM kompenzovaným dietou (GDM-D) a 9 žen s GDM kompenzovaným na inzulinoterapii (GDM-I). U všech žen byl stanoven body mass index (BMI) před těhotenstvím a 3. den po porodu. Ve všech skupinách se shodoval věk probandek a byly zastoupeny ženy s různým BMI, i přesto však byl průměrný BMI byl u souborů žen s gestačním diabetem vyšší než u kontrol (Tab. 4).

Tabulka 4. *Základní antropometrické charakteristiky vyšetřovaného souboru žen (průměr \pm SE). Statistická významnost rozdílů sledovaných parametrů ve skupinách žen s GDM proti kontrolní skupině $P=$; $N =$ velikost skupiny.*

MATKY	Kontroly	GDM-I	GDM-D	$P=$
Počet (N=)	(N = 13)	(N = 9)	(N = 5)	
BMI před graviditou [kg.m⁻²]	22,66 \pm 0,92	30,12 \pm 2,26	26,78 \pm 3,04	0,035
BMI 3. den po porodu [kg.m⁻²]	25,53 \pm 1,00	33,12 \pm 2,37	28,30 \pm 2,31	0,011
% tělesného tuku 3.d.p.p.	32,35 \pm 1,33	39,61 \pm 2,35	34,12 \pm 3,69	0,075
kg tělesného tuku 3.d.p.p.	23,49 \pm 1,51	37,32 \pm 5,39	27,30 \pm 5,47	0,166
Věk [roky]	33,1 \pm 1,25	34,6 \pm 2,50	33,2 \pm	1,16

Porodní hmotnost ani délka novorozenců vyšetřovaných žen se mezi jednotlivými skupinami signifikantně nelišily. V jednotlivých vyšetřovaných skupinách novorozenců nebylo zcela vyrovnané zastoupení obou pohlaví (Tab. 5).

Tabulka 5. Základní antropometrické charakteristiky novorozenců ve vyšetřovaném souboru (průměr ± SE). N = velikost skupiny.

DĚTI (dělení dle matek)	Kontroly	GDM-I	GDM-D	P=
Počet (N=)	(N = 13)	(N = 9)	(N = 5)	
Porodní hmotnost [kg]	3,42 ± 0,14	3,47 ± 0,27	3,46 ± 0,13	0,973
Porodní délka [m]	0,51 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,083
Pohlaví N= [dívky / hoši]	8/5	7/2	1/4	

3.3.2 Odběr a zpracování biologických vzorků

Pro uchování vzorků jednotlivých tkání do dalšího zpracování bylo použito odběrové medium RNAlater (Qiagen). S mediem a bioptovanými vzorky bylo manipulováno podle protokolu výrobce. Od každého typu bioptované tkáně bylo odebráno cca 300 – 400 mg tkáně a toto množství rozděleno do zkumavek s mediem, maximálně 100 mg tkáně na 1 ml prezervačního média. Všechny vzorky byly řádně označeny.

Placentární tkáň byla odebrána bezprostředně (do 5 minut) po vybavení placenty. Odběr syncytiotrofoblastu bez makroskopicky zřejmých cév byl proveden z fetální strany placenty po snesení amnia ze střední části kotyledonu přibližně v polovině výšky placenty. Viscerální i subkutánní tuková tkáň byly odebrány po porodu plodu a ošetření dělohy, tedy zhruba 20 – 25 minut po zahájení operace. Viscerální tuková tkáň byla získána z velkého omenta, subkutánní tuková tkáň z podbříšku z místa laparotomie podle Pfannenstiela.

3.3.3 Izolace a charakterizace celkové RNA

Kvalita RNA je jedním z nejdůležitějších faktorů nezbytných pro dosažení úspěšné analýzy genové exprese. [163] Metody analýzy RNA, které byly prováděny, vyžadovaly získání kvalitní, nedegradované RNA o vysokém výtěžku.

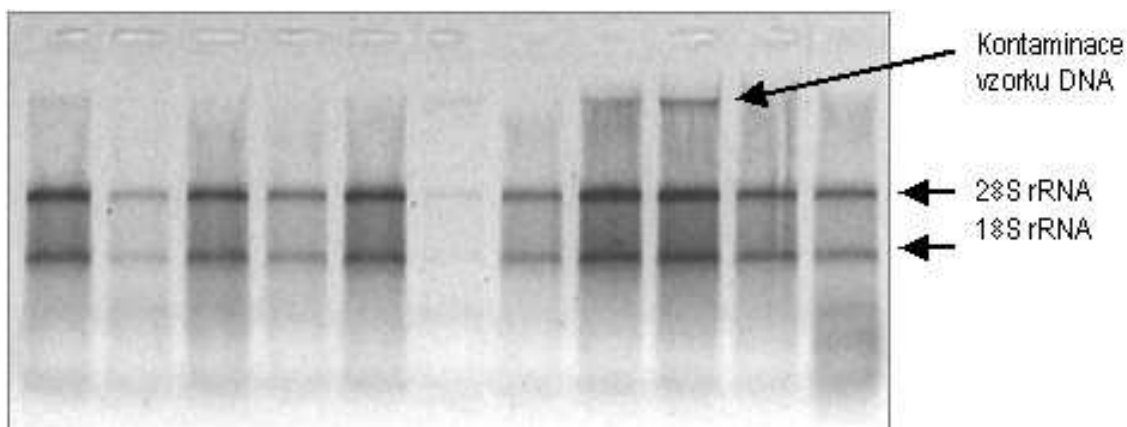
Celková RNA ze subkutánního a viscerálního tuku byla izolována pomocí RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen), z placenty byla izolována pomocí RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen) podle protokolu výrobce a eluována do 45 µl sterilní redestilované vody bez RNA degradujících enzymů.

U získané RNA byla provedena kontrola kvality:

a) spektrofotometricky: měřením absorbance při 260 a 280nm, po zředění 20x, byla vypočítána koncentrace podle vzorce: $c [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 40 \times \text{faktor ředění (20)}$; dále byla určena čistota vzorku vypočítáním koeficientu 260/280, a pro další analýzu byla použita pouze celková RNA s poměrem $> 1,79$.

b) elektroforézou na agarózovém gelu: 2 μ l vzorku byly smíchány se 4 μ l RNA pufru a 10min denaturovány při 65°C, poté byly přeneseny do ledové lázně a nanесeny na 1,5% agarózový gel obsahující ethidium bromid. V případě čisté nepoškozené celkové RNA se po osvětlení gelu UV lampou objevily dva ostré proužky odpovídající 28S a 18S rRNA (Obr. 13).

Obrázek 13. Příklad gelové elektroforézy celkové RNA izolované z tkání.



3.3.4 Expresní arrays

Expresní arrays nebo microarrays je metoda hodnocení genové exprese na úrovni mRNA. Výhodou této technologie je současná analýza řady genů v jednom vzorku zároveň [164]. Naopak, limitujícím faktorem je nižší přesnost stanovení rozdílů genové exprese, ve srovnání s kvantitativním RT-PCR.

3.3.4.1 *Syntéza cRNA*

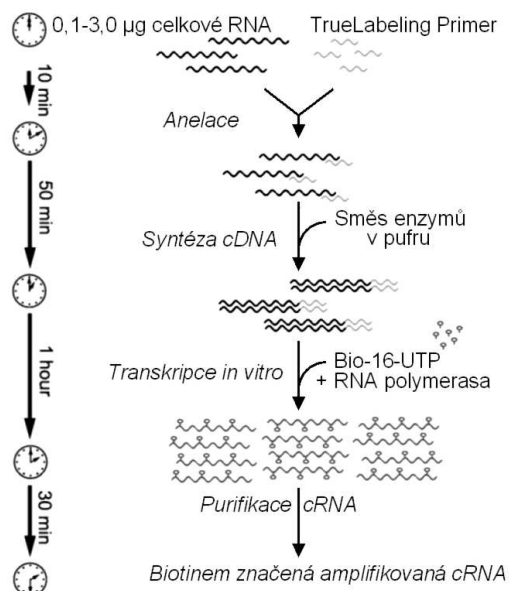
Komplementární značená RNA byla připravena pomocí pomoci kitu TrueLabeling-AMP 2.0 Kit (SuperArray) podle protokolu výrobce (Obr. 14). Jako templát byla použita celková RNA. Takto připravená cRNA byla použita ke stanovení exprese vybraného spektra genů v jednotlivých vzorcích metodou cRNA array.

Pro přípravu dostatečného množství cRNA byly pro každý vzorek použity 3 μ g příslušné RNA.

Připravená cRNA byla purifikována pomocí ArrayGradeTM cRNA Cleanup kitu, a poté byla spektrofotometricky při vlnové délce 260nm změřena její absorbance při 20-ti násobném

ředění vzorku. U všech vzorků byla stanovena koncentrace a výtěžek cRNA podle vzorců:
koncentrace ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) = $A_{260} \times 0,8$; výtěžek (μg) = $A_{260} \times 40$.

Obrázek 14. Schéma přípravy cRNA pomocí TrueLabeling-AMP2.0 kitu.



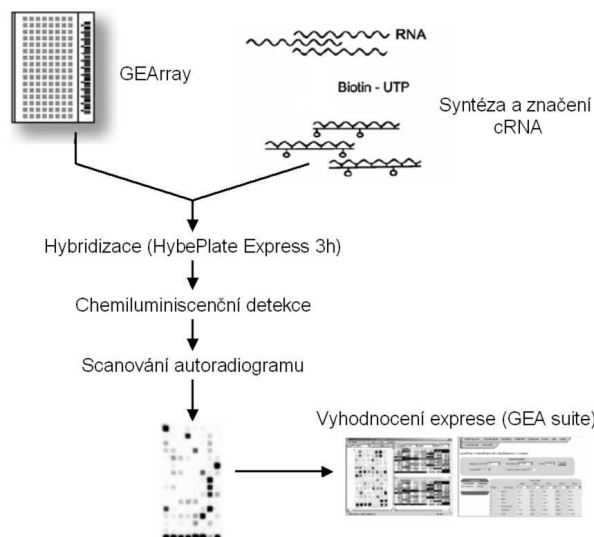
3.3.4.2 cRNA array

Pro vyšetření vybraných vzorků byl vybrán array zaměřený na geny zapojené v signální cestě inzulinového receptoru (OHS – 030, Oligo GEArray Human Insulin Signaling Pathway Microarray, SuperArray), ve kterém byla stanovena exprese 112 genů (celkem 128 spotů včetně HK genů a kontrol).

Při provádění arrays bylo postupováno podle protokolu výrobce (Obr. 15). Před začátkem hybridizace značené cRNA na nylonové membrány GEArray byla každá membrána nejdříve v plastové komůrce inkubována 5min při pokojové teplotě se 2ml redestilované vody, která byla poté opatrně odstraněna a nahrazena 2ml roztoku GEArray Hybridization Solution předehřátého na 60°C , s nímž byly arraye inkubovány 1hod při 60°C za stálého třepání rychlostí 1200rpm na třepačce s termoregulací. Poté byl tento roztok odstraněn a nahrazen hybridizační směsí složenou ze 2ml roztoku GEArray Hybridization Solution předehřátého na 60°C a $4\mu\text{g}$ cRNA. Hybridizace probíhala 4 hodiny při teplotě 60°C za stálého třepání rychlostí 1200 rpm. Následně byla hybridizační směs velmi opatrně odsáta, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Následoval sled promývání dle protokolu výrobce. Na závěr byly membrány vyvolány pomocí GEArray Chemiluminescent Detection kitu (Superarray) a

exponovány na fotografický film X-OMAT (Kodak) po dobu 1-20 min. Po vyvolání byly autoradiogramy digitalizovány pomocí scanneru ScanJet 4370 (HP) a ve formátu jpg (256 odstínů šedi) vloženy do vyhodnocovacího softwaru.

Obr. 15. Schéma postupu přípravy a vyhodnocení cRNA array (SuperArray).



Vyhodnocení digitalizovaných dat z arrayů bylo provedeno pomocí GEAArray Expression Analysis Suite (GEA Suite; Superarray) 1.0 a 2.0 (<http://geasuite.superarray.com/index.jsp>). Pro relativní kvantifikaci exprese sledovaných cílových genů byly vybrány tři HK geny: RPS27A, GAPDH a B2M. Hranice změn, které byly dále zpracovány je byla stanovena jako 1,2-násobek (up- nebo down-regulace) u žen s GDM proti kontrolní skupině.

Expresní data získaná po normalizaci z GEA Suite byla následně zpracovávána pomocí programu Multi Experiment Viewer 4.0 (MeV; TIGR - <http://www.tm4.org/mev.html>). Softwarová analýza dat v MeV zahrnovala jednak vytvoření clustergramů, které sloužily pro vyhodnocení „rozdílnosti“ globální exprese jednotlivých vzorků v analyzovaných tkáních. Následně provedená SAM analýza (Significance Analysis of Microarrays) [165] pak sloužila k vytipování skupiny genů, jejíž část byla kvantifikována na rozsáhlejší souboru studované populace žen s GDM a kontrol pomocí qPCR.

3.3.5 Kvantitativní RT-PCR v reálném čase (qPCR)

Kvantitativní RT-PCR v reálném čase (qPCR) je metoda umožňující kvantifikaci genové exprese sledovaných genů na úrovni mRNA, tedy stanovení co nejpřesnějšího počtu kopií mRNA pro sledovaný gen na určitou jednotku. Lze provádět kvantifikaci absolutní, při níž se

stanovuje počet kopií konkrétní mRNA například na počet buněk. Častěji se však provádí kvantifikace relativní, při níž jsou jako normalizační faktory využívány geny, které se v konkrétních buňkách či tkáních exprimují standardně a jejichž exprese není prováděným experimentem ovlivněna, takzvané „house-keeping“ geny (HK geny).

Templátem pro vlastní qPCR je jednořetězcová komplementární DNA (cDNA) získaná z mRNA reverzní transkripcí.

Principem qPCR je měření fluorescence v každém cyklu PCR. Pro kvantifikaci množství DNA se používají nespecifické na dsDNA se vážící fluorochromy (např. SYBR Green I), fluorochromy značené primery (např. LUXTM) nebo značené sekvenčně specifické probey [166]. Fluorescence roste shodně s rostoucím množstvím dsDNA v reakci, tedy s nárůstem počtu PCR produktů.

Pro fluorescenční signál je stanovena detekční hranice. Její překonání se zaznamenává jako cyklus, ve kterém k tomuto překročení došlo (tzv. „crossing-point“).

Jsou-li shodné efektivy (E_f) qPCR jednotlivých sledovaných genů, je počet cyklů nutných k dosažení detekční hranice nepřímo úměrný počtu templátů určitého genu vstupujících do reakce, což se také využívá při vyhodnocování výsledků qPCR.

Je-li 100% účinnost amplifikace PCR, potom je v reakci na konci 1 cyklu 2x vyšší počet ampliconů, než kolik jich bylo přítomno na začátku tohoto cyklu PCR. $E_f=2$ (resp. $E_f=1+1$). Probíhá-li konkrétní PCR např. se 70% účinností, je množství ampliconů přítomných v reakci na konci cyklu o 70% vyšší, než jaké bylo množství na začátku cyklu, tedy v reakci je na konci cyklu 1,7 násobek množství ampliconů přítomných na začátku tohoto cyklu PCR. Efektivita této hypotetické PCR je tedy $E_f=(1+0,7)=1,7$.

Tabulka 6. *Hlavní faktory ovlivňující výsledky qPCR.*

Komplikace qPCR	Prevence komplikací
Kvalita RNA	Stanovení koncentrace a kvality RNA spektrofotometricky Ověření kvality RNA elektroforeticky Určení RIN (RNA integrity number)
Kontaminace vzorku přítomností DNA	Ošetření vzorku DNA degradujícím enzymem Navržení primerů na exon-exonová spojení, event. PCR produkt překlenující exon-exonové spojení
Syntéza cDNA	Volba kvalitní reverzní transkriptázy s vysokou účinností RT
Účinnost vlastní qPCR	Optimalizace anelačních teplot Optimalizace koncentrace Mg^{2+} v reakční směsi Stanovení efektivy jednotlivých typů qPCR
Vyhodnocení dat	Zohlednění zjištěných efektivit qPCR při vyhodnocování relativní exprese sledovaných genů pomocí vyhodnocovacích softwarů

V reálné situaci ovšem obvykle není ideální, tedy 100%, účinnost PCR, proto je nutné touto informací disponovat a zohlednit ji při vyhodnocování relativní exprese jednotlivých genů.

qPCR je metodou s velkým dynamickým rozsahem i velmi přesnou. Kvalitu a objektivitu získaných výsledků však ovlivňuje řada faktorů, které je nutno zohlednit při přípravě qPCR projektu. (Tab. 6.)

3.3.5.1 Ošetření vzorku RNA pomocí DNase a syntéza cDNA

Všechny vzorky RNA byly před syntézou cDNA ošetřeny DNA degradujícím enzymem DNase (Fermentas), aby bylo zajištěno, že při kvantifikace genové exprese na úrovni mRNA není přítomna kontaminující DNA – protokol (Tabulka 7.).

Tabulka 7. *Protokol ošetření celkové RNA DNasou před syntézou 40μl cDNA.*

Reagencie	Objem [μl]
RNA	19,2
dd H ₂ O	
10x pufr	2,4
DNase	2,4
37°C (30')	
EDTA	2,4
65°C (10'), pak na led	
Σ	26,4

Vstupní objem RNA závisí na její koncentraci, je přizpůsoben tak, aby pro následnou syntézu cDNA byly dány 4μg (resp. 2μg) RNA z placenty a 2μg (resp. 1μg) RNA z tukových tkání (v závislosti na koncentraci celkové RNA).

Celý objem takto ošetřené RNA byl následně použit pro syntézu cDNA.

DNase [1U/μl]; EDTA [25mmol/l]

Ze vzorků RNA ošetřených DNasou byla metodou reverzní transkripce připravena komplementární DNA (cDNA). Syntéza cDNA byla provedena pomocí rekombinantní virové RNA dependentní DNA polymerázy SuperScript III (Invitrogen) (Tab. 8).

Od každého vzorku bylo připraveno 2x40μl cDNA. Výsledné koncentrace cDNA byly tedy 100ng/μl (resp. 50ng/μl) u cDNA z placenty a 50ng/μl (resp. 25ng/μl) u cDNA z tukových tkání.

Tabulka 8. *Protokol syntézy 40μl cDNA.*

Reagencie	Objem [μl]
RNA ošetřená DNasou	26,4
Hexanukleotidy	1,0
50x dNTP's	1,6
65°C (10'); potom na led	
DTT	2,0
5x pufr	8,0
SSIII	1,0
25°C (5'); 50°C (50'); 70°C (15'); 20°C (∞)	

*náhodné hexanukleotidy (Roche) [30pmol/μl];
50x dNTP's (Invitrogen); DTT [100mmol/l];
SSIII [200 U/μl]*

Takto získaná cDNA byla skladována při -20°C a poté byla použita ke stanovení exprese vybraných genů ve vyšetřovaných tkáních.

3.3.5.2 *Optimalizace qPCR*

Vzhledem k rozsáhlosti projektu bylo třeba co nejvíce sjednotit reakční podmínky u všech vyšetřovaných genů při dosažení co možná nejlepší efektivity qPCR.

Pro qPCR pro různé geny byly použity primery ze dvou zdrojů:

1. komerčně dostupné páry primerů (SuperArray):

vyšetřované geny: CD68, ESR1, ESR2, FBP1, IGFBP1, IL-6, IL-8, IRS2, LDLR, NOS2A, PAI1, PIK3CA, PIK3CB, PRL, RETN, TNF-A

2. námi navržené primery (syntéza primerů Generi Biotech; sekvence primerů Tab. 9):

house-keeping geny: B2M, GAPDH, PBGD

vyšetřované geny: ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2, CFD, CSH1, GLUT3, GLUT4, IDE, LIPE, LEP, PPAR-A

Tabulka 9. *Sekvence námi designovaných primerů.*

Gen	Forward	Reverse
B2M	5'-ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTA-3'	5'-TCGGATGGATGAAACCCAGACACA-3'
GAPDH	5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACGG-3'	5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGTATGG-3'
PBGD	5'-ATGTCTGGTAACGGCAATGCGG-3'	5'-TGTCCTGTGGTGGACATAGC-3'
ADIPOQ	5'-GTGATGGCAGAGATGGCACCC-3'	5'-AGGCACCTTCTCCAGGTTCTCC-3'
ADIPOR1	5'-TTGTGTACAAGGTCTGGGAGGGA-3'	5'-CAGCACGAAACCAAGCAGATGG-3'
ADIPOR2	5'-CTGATGGCCAGCCTCTACATCAC-3'	5'-CCCGCCGATCATGAAACGAAAC-3'
CFD	5'-CCATCGACCACGACCTCCT-3'	5'-GCCACGTCGCAGAGAGTTC-3'
CSH1	5'-AGAGCTGCTCCGCATCTCC-3'	5'-GTCTTCCAGCCTCCCCATCAG-3'
GLUT3	5'-CGGACTCTTCGTCAACCGCT-3'	5'-CCAGGATCAGCATTTCAACCGAC-3'
GLUT4	5'-CGGGCTTCCAACAGATAGGCTC-3'	5'-CCCAGCCACGTCTCATTGTAGC-3'
IDE	5'-GGCATGAAGGTCTGGAAGTCTG-3'	5'-TCCTTCTCGGTCAAGTCCACA-3'
LIPE	5'-CCAGAAGATGTCGGAGCCATAG-3'	5'-GGTCAGGTTCTTGAGGGAATCCG-3'
LEP	5'-CTATGTCCAAGCTGTGCCATCC-3'	5'-CTGCCAGTGTCTGGTCCATCTTG-3'
PPAR-A	5'-CGCAATCCATCGGCGAGGATA-3'	5'-CTCCACTGGGAGACTCGTCCA-3'

Primery byly navrženy tak, aby alespoň jeden primer z páru nasedal na exon-exonové spojení nebo pokud nebylo možno dodržet tuto podmínku, aby PCR produkt překlenoval dlouhý intron ($>3000\text{bp}$), pokud by se amplifikoval z templátu DNA, čímž vzhledem k elongačnímu času 10s bylo zamezeno amplifikaci z případně kontaminující genomové DNA (přítomnost

kontaminující DNA by měla být vyloučena použitím DNasy – *Odd. 3.3.5.1 Ošetření vzorku RNA pomocí DNase a syntéza cDNA*).

Pokud jsou u daného genu popsány různé sestřihové varianty, byly primery navrženy tak, aby se amplifikovala plně funkční, alternativně nesestřižená varianta mRNA. Velikost amplikonů byla v rozmezí 100-230bp.

Po optimalizaci anelačních teplot (T_{an}) byly vybrány 2 nejvhodnější, a to 60°C a 66°C. qPCR všech 3 HK genů byly zoptimalizovány pro obě T_{an} , při $T_{an}=60^\circ\text{C}$ probíhaly qPCR s primery od firmy SuperArray a při $T_{an}=66^\circ\text{C}$ probíhaly qPCR s primery z naší laboratoře.

Dále byla při vybrané teplotě (60 a/nebo 66°C) provedena optimalizace koncentrace hořečnatých kationtů přítomných v reakčním pufru. Optimální koncentrace MgCl_2 pro jednotlivé qPCR jsou uvedeny v Tab. 10.

Tabulka 10. *Koncentrace MgCl_2 pro qPCR jednotlivých genů při T_{an} 66°C a/nebo 60°C.*

$T_{an}=66^\circ\text{C}$				$T_{an}=60^\circ$					
Gen	Mg^{2+}	Gen	Mg^{2+}	Gen	Mg^{2+}	Gen	Mg^{2+}	Gen	Mg^{2+}
B2M	3,0	CSH1	2,0	B2M	3,0	IGFBP1	4,0	PIK3CA	4,0
GAPDH	4,0	GLUT3	3,0	GAPDH	3,0	IL-6	2,0	PIK3CB	3,0
PBGD	2,0	GLUT4	2,0	PBGD	2,0	IL-8	2,0	PRL	3,0
ADIPOQ	2,0	IDE	4,0	CD68	2,0	IRS2	2,0	RETN	2,0
ADIPOR1	2,0	LIPE	2,0	ESR1	1,75	LDLR	3,0	TNF-A	2,0
ADIPOR2	2,0	LEP	1,75	ESR2	3,0	NOS2A	2,0	Koncentrace Mg^{2+}	
CFD	3,0	PPAR-A	2,0	FBP1	2,0	PAI1	1,75		µmmol/l

Pro všechny reakce za vybraných optimálních podmínek byly provedeny negativní kontroly PCR, které byly negativní.

U primerů, které byly navrženy v naší laboratoři byla ověřena specifita qPCR sekvenováním PCR produktů.

Pro všechny geny byly za optimálních reakčních podmínek zkonstruovány kalibrační křivky z dilučních řad cDNA, ze kterých byla následně stanovena efektivita jednotlivých typů qPCR.

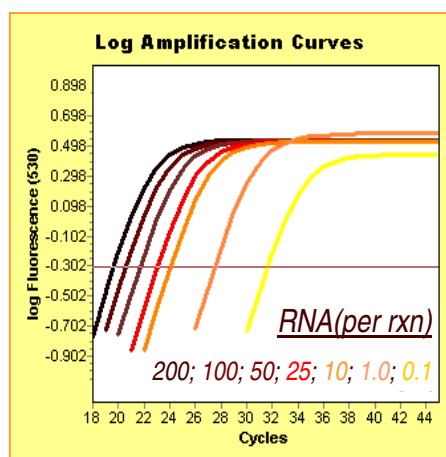
Množství cDNA (resp. RNA) použitá pro konstrukci kalibrační křivky na reakci (10µl) byla:

200; 100; 50; 25; 10; 1,0 a 0,1ng. Všechny pokusy byly provedeny v nezávislých dvojicích.

Efektivita (E_f) amplifikace jednotlivých typů qPCR získané na základě získaných kalibračních křivek jsou uvedeny v Tab. 11.

Tabulka 11. *Přehled efektivit jednotlivých qPCR za optimalizovaných reakčních podmínek.*

Gen	Ef	Gen	Ef	Gen	Ef
B2M (66°C)	1,78	GLUT3	1,94	IL-6	2,08
GAPDH (66°C)	1,92	GLUT4	1,92	IL-8	1,97
PBGD (66°C)	1,57	IDE	2,04	IRS2	1,90
B2M (60°C)	1,83	LIPE	1,99	LDLR	1,86
GAPDH (60°C)	1,90	LEP	1,77	NOS2A	1,69
PBGD (60°C)	1,51	PPAR-A	1,77	PAI1	1,92
ADIPOQ	1,92	CD68	1,88	PIK3CA	1,70
ADIPOR1	1,76	ESR1	1,88	PIK3CB	1,99
ADIPOR2	1,72	ESR2	1,76	PRL	1,86
CFD	2,02	FBP1	1,91	RETN	2,10
CSH1	1,73	IGFBP1	1,97	TNF-A	2,00



Příklad křivek qPCR z různých množství cDNA (resp. RNA) vstupujících do reakce při konstrukci kalibrační křivky. Přístroj: LightCycler 2.0 (Roche)

3.3.5.3 Postup vyšetření souboru

Měření byla prováděna na stroji LightCycler 2.0 (Roche).

Pro qPCR byl použit kit obsahující SYBRGreen, LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, (Roche); bylo postupováno podle protokolu výrobce. Reakční objem byl 10 μ l.

Vlastní amplifikační protokol byl uzpůsoben délce amplikonů a kinetice reakcí (Tab. 12).

Do jedné qPCR reakce jsme dávali 1 μ l nasyntetizované cDNA, tedy 100ng (resp. 50ng) cDNA z placentární tkáně a 50 (resp. 25ng) cDNA ze subkutánní a viscerální tukové tkáně.

Množství primerů na 1 reakci (tedy na 10 μ l) bylo 4 pmol každého.

Pro minimalizaci chyb a zkreslení výsledků byly provedeny následující kroky:

- Všechna stanovení byla prováděna ve dvojicích.
- Všechny geny od jednotlivých vzorků se stejnou anelační teplotou byly vyšetřeny najednou z jednoho mastermixu obsahujícího cDNA.
- Pro minimalizaci chyby pipetování byl vždy připraven mastermix obsahující cDNA, MIX HotStart polymerázy, pufru, SYBRGreenu a ddH₂O, připraveného v objemu 7 μ l na reakci. Druhý mastermix obsahoval pár primerů pro amplifikaci konkrétního genu, MgCl₂ o odpovídající koncentraci a ddH₂O, a byl pipetován v objemu 3 μ l na reakci.
- Pravidelně byly vyšetřovány negativní kontroly ze stejných reagensů, které byly použity do vlastního pokusu pouze neobsahující cDNA jako templát PCR.

- Protože byla hodnocena také exprese některých zánětlivých markerů (IL-6, IL-8 a TNF α), byla pro zhodnocení míry infiltrace testovaných vzorků imunokompetentními buňkami použita kvantifikace exprese CD68, jako pro imunokompetentní buňky specifického markeru.

Tabulka 12. A. Protokol amplifikace (měření fluorescence: + jednorázově, vždy na konci elongace; +++ kontinuálně po dobu celého kroku qPCR); B. Grafické znázornění protokolu qPCR.

A.	Krok qPCR	Teplota [°C]	Délka trvání	Měření fluorescence	Počet cyklů
	Vstupní denaturace	95	10min	-	1
	Amplifikace				45
	• Denaturace	95	10s		
	• Anelace	60/66	10s		
	• Elongace	72	10s	+	
	Křivka tání	72 - 95	~3min	+++	1
	Chlazení	40	∞	-	1
B.					

Tabulka 13. Přehled genů, jejichž exprese na úrovni mRNA byla sledována v jednotlivých typech tkání. (+ exprese genu byla vyšetřena; - exprese genu vyšetřena nebyla)

Gen	Subkutánní tuk	Viscerální tuk	Placenta	Gen	Subkutánní tuk	Viscerální tuk	Placenta
B2M	+	+	+	IGFBP1	-	+	+
GAPDH	+	+	+	IL-6	+	+	+
PBGD	+	+	+	IL-8	+	+	+
ADIPOQ	+	+	+	IRS2	+	+	+
ADIPOR1	+	+	+	LIPE	+	+	+
ADIPOR2	+	+	+	LEP	+	+	+
CD68	+	+	+	LDLR	+	+	-
CFD	+	+	+	NOS2A	-	+	+
CSH1	-	-	+	PAI1	+	+	+
ESR1	+	+	+	PIK3CA	+	+	+
ESR2	+	+	+	PIK3CB	+	+	+
FBP1	+	+	+	PPAR-A	+	+	-
GLUT3	-	-	+	PRL	-	+	-
GLUT4	+	+	+	RETN	+	+	+
IDE	+	+	+	TNF-A	+	+	+

Spektrum genů, u kterých jsme sledovali jejich expresi na úrovni mRNA se částečně odlišovalo mezi jednotlivými typy vyšetřovaných tkání. Expres sledovaných adipokinů byla

stanovena ve všech typech vyšetřovaných tkání. Dále bylo vyšetření genové exprese metodou qPCR provedeno u těch genů a tkání, ve kterých jsme screeningovou metodou arrays zaznamenali změny exprese (Tab. 13).

3.3.5.4 Kvantifikace změn genové exprese a jejich statistické vyhodnocení

Pro hodnocení míry relativní exprese sledovaných genů byly použity softwary umožňující při vyhodnocování zohlednit efektivitu amplifikace.

Pro hodnocení relativní míry exprese sledovaných genů v jednotlivých typech tkání napříč vyšetřovanými skupinami byl použit software qGENE, který je aplikací tabulkového kalkulátoru Excel a umožňuje hodnotit míru exprese sledovaného genu proti jednomu HK genu u každého jednotlivého vzorku.

Dynamika změn relativní exprese u sledovaných genů mezi jednotlivými skupinami byla hodnocena pomocí kvantifikačního softwaru REST-384–verze 1, který je aplikací tabulkového kalkulátoru Excel [167, 168]. Pro hodnocení dynamiky změn byla použita normalizace (vstupního množství RNA, efektivita reverzní transkripce a vlastní qPCR) podle 3 výše uvedených HK genů, tedy B2M, GAPDH a PBGD, která snižuje riziko získání falešně pozitivních nebo negativních výsledků.

Pro statistické zhodnocení výsledků používá tento program „Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test“, který je součástí kvantifikačního softwaru REST-384–verze 1 [168].

3.4 Stanovení sérových koncentrací vybraných adipokinů a dalších biochemických markerů z maternální a fetální krve při porodu

3.4.1 Vlastnosti vyšetřovaného souboru

Tato část studie byla provedena na stejném souboru žen, ve kterém byly stanoveny sérové koncentrace vybraných adipokinů. (viz. 3.3.1 Charakteristika vyšetřovaného souboru), tedy 14 žen s GDM (9 na inzulínu a 5 kompenzovaných dietou) a 13 zdravých těhotných tvořících kontrolní skupinu.

3.4.2 Odběr a zpracování krevních vzorků

Od každé probandky byla peroperačně při porodu odebrána periferní žilní srážlivá krev pro izolaci séra a nesrážlivá plná krev pro stanovení glykovaného hemoglobinu (Hgb). Po porodu plodu a vybavení placenty byla z pupečnickových cév odebrána fetální srážlivá krev pro izolaci séra. Vzorky byly od doby odběru do separace séra uchovány při pokojové teplotě do vytvoření koagula. Po vytvoření koagula bylo sérum separováno centrifugací (4000 ot./min), rozpipetováno na alikvotní objemy a do dalšího použití skladováno při -80°C .

3.4.3 Stanovení sérových koncentrací vybraných adipokinů a dalších biochemických parametrů.

Z adipokinů byly hodnoceny sérové koncentrace adiponectinu, leptinu a resistinu. Sérové koncentrace adiponectinu byly měřeny ve dvojicích komerčně dostupným ELISA kitem (Human Adiponectin ELISA kit, Linco Research, USA). Sérové koncentrace leptinu a resistinu byly měřeny ve dvojicích komerčně dostupnými ELISA kity (BioVendor, ČR).

V maternální krvi byly dále stanoveny sérové koncentrace inzulínu komerčně dostupným RIA testem (INSULIN Antibody Coated Tube-125I RIA Kit, MP Biochemicals, USA) a koncentrace celkového insulin-like growth factor binding proteinu 1 (IGFBP1) metodou ELISA pomocí komerčně dostupného kitu (DSL-10-7800 Total IGFBP-1 Coated Well ELISA Kit, Diagnostic Systems laboratories, USA).

Ze získaných vzorků maternální periferní žilní krve bylo dále na Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN rutinními biochemickými metodami stanoveno procento glykovaného hemoglobinu a sérové koncentrace glukózy, C-peptidu, triacylglycerolů, prolaktinu, estradiolu a IGF1. Podrobnosti k jednotlivým metodám jsou uvedeny na stránkách ÚKBLD <http://ukb.lf1.cuni.cz>.

3.4.4 Metody měření inzulínové senzitivity

Pro měření inzulínové senzitivity u člověka lze provádět několika způsoby, lišícími se technikou, finanční i časovou náročností, ale také přesností získaných výsledků.

Pro pacienta časově nejméně náročné je stanovení různých indexů inzulínové senzitivity, k jejichž výpočtu stačí informace určitých biochemických parametrů získaných z jednorázového odběru periferní žilní krve ráno nalačno. Pro svou minimální časovou i finanční náročnost jsou tyto indexy často užívány, zejména v rozsáhlejších klinických

studiích. Mezi tyto indexy patří HOMA index (ve svých různých modifikacích), QUICKI index a v poslední době také užívaný Mc'Auleyho index. Pro základní hodnocení inzulínové senzitivity lze také použít plazmatické (sérové) koncentrace inzulínu po 8–12 hodinovém lačnění, přičemž kritériem pro stav inzulínové rezistence jsou hodnoty inzulínu nad 75. percentilem populace. Nevýhodou všech metod používajících pro hodnocení plazmatické (resp. sérové) koncentrace inzulínu je nemožnost jejich využití u jedinců užívajících exogenní inzulín, protože běžně používané laboratorní metody pro stanovení inzulínemie nejsou schopny odlišit exogenní inzulín od endogenně produkovaného. U těchto jedinců se proto pro posouzení endogenní produkce inzulínu používají hodnoty plazmatických (sérových) koncentrací proinzulínu a C-peptidu.

Dalším technicky nekomplikovaným je orální glukózový toleranční test (oGTT), který je ovšem pro vyšetřovanou osobu časově náročnějším vyšetřením (obv. se provádí dvouhodinový test se 75g glukózy).

Zřejmě dosud nejpřesnější diagnostiku zhoršené odpovědi tkání na stimulaci inzulínem je možno provést pomocí euglykemického hyperinzulinemického clampu a nebo metody FSIGT (frequently sampled intravenous glucose tolerance test), které jsou považovány za standardy stanovení inzulínové senzitivity, ale které se pro svou velkou časovou i technickou náročností používají zejména při vědeckých projektech a na zvířecích modelech. Vůči těmto dvěma způsobům se porovnává přesnost hodnocení inzulínové senzitivity ostatními metodami [7].

HOMA index (Homeostasis Model Assessment) matematický index pro stanovení inzulínové senzitivity, který se vypočítá z plazmatických (resp. sérových) koncentrací glukózy a inzulínu: $HOMA = (G \times I) / 22,5$; G je glykémie nalačno [mmol/l]; I je inzulínemie nalačno [mIU/l]; 22,5 je konstanta [7]. S narůstající inzulínovou rezistencí stoupá hodnota HOMA indexu. Jako vhodnější pro určení lačné inzulínemie bylo z důvodu pulzatilní sekrece inzulínu doporučeno odebírat 3 vzorky periferní krve v pětiminutových intervalech a pro výpočet použít hodnotu průměrnou. Toto měření je přesnější, ale příliš se v praxi nepoužívá [7].

QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index) je relativně jednoduchý matematický vzorec, který pro hodnocení inzulínové senzitivity opět využívá hodnot plazmatických (sérových) koncentrací inzulínu a glukózy: $QUICKI = 1 / (\log I + \log G)$; I je inzulínemie nalačno [mIU/l]; G je glykémie nalačno [mg/dl]; pro hodnoty glykémie uváděné v [mmol/l] platí vzorec pro výpočet: $QUICKI = 1 / [\log I + \log (G \times 18)]$. Získané hodnoty jsou nejvyšší

u jedinců s dobrou inzulínovou senzitivitou, snižené u obézních a nejnižší u jedinců s diabetem mellitem [7, 169].

Na to, zda výsledky měření inzulínové senzitivity měřené pomocí HOMA a QUICKI indexů korelují s daty získanými pomocí euglykemického hyperinzulinemického clampu nejsou jednotné názory, a různé studie dokládají odlišné výsledky. Byla nalezena dobrá korelace HOMA indexu s clampem při posuzování inzulínové senzitivity během těhotenství [170], a také u obézních těhotných [171]. Na druhé straně autoři studie porovnávající metody stanovení inzulínové rezistence u žen se syndromem polycystických ovarií (PCOS), při kterém je inzulínová rezistence jedním z hlavních rysů, uvádí špatnou korelaci výsledků HOMA i QUICKI indexů s hodnotami inzulínové rezistence získané pomocí euglykemického hyperinzulinemického clampu [172].

Mc'Auleyho index využívá pro hodnocení inzulínové senzitivity plazmatické (sérové) koncentrace inzulínu (*Ins*) [mIU/l] a triacylglycerolů (*TAG*) [mmol/l] nalačno;

Mc'Auleyho index = $\exp [2,63 - 0,28 \ln (Ins) - 0,31 \ln (TAG)]$ [7].

Na souboru pacientů po renální transplantaci byly provedeny různé metody hodnocení inzulínové senzitivity, ze kterých vyplývá, že Mc'Auleyho index koreluje s hyperinzulinemickým euglykemickým clampem lépe, než hodnoty HOMA a QUICKI indexu [173].

oGTT je metoda měření inzulínové senzitivity nejčastěji používaná pro stanovení diagnózy diabetu mellitu, která se provádí po 10-12 hodinovém lačnění. Existuje několik variant jejího provedení lišících se v množství perorálně podané glukózy a časech odběru krevních vzorků. U netěhotných se obvykle podává 75g glukózy, kterou vyšetřovaná osoba vypije s cca 200-300 ml vody během 3 minut. Glykémie se stanovuje nalačno, a potom za 1 a 2 hodiny po aplikaci glukózy. U těhotných se jako screening GDM používá modifikovaný oGTT – glukózový zátěžový test (O'Sullivanův test) s 50g perorálně aplikované glukózy a odběrem krve nalačno a 1 hodinu po aplikaci glukózy; za patologickou je považována glykémie >7,8 mmol/l [43]. Screening se provádí mezi 24. a 28. týdnem gestace, kdy se již předpokládá dostatečná manifestace diabetogenních účinků v těhotenství produkovaných hormonů [7]. Při suspektním nebo patologickém výsledku se zátěží 50g glukózy nebo u těhotných se zatíženou anamnézou se provádí klasický oGTT se 75g glukózy perorálně (Tab. 14). K určitému zkreslení výsledků získaných z oGTT může dojít z důvodu ne stejného rychlého vyprazdňování žaludku a vstřebávání glukózy z GIT. Možnou námitkou proti oGTT také je,

Ože nezohledňuje dynamiku jednotlivých složek inzulínové senzitivity a sekrece inzulínu [7].

Euglykemický hyperinzulinemický clamp je metoda, která je akceptována jako standard pro hodnocení inzulínové senzitivity, která umožňuje kvantifikovat jak citlivost β -buněk vůči účinkům inzulínu. U těhotných žen se ovšem provádí naprosto výjimečně, například u longitudinálních studií na velmi omezeném počtu probandek.

Tabulka 14. *Hodnoty glykémie při oGTT prováděném v těhotenství.*

	Nalačno	Po 1 hodině	Po 2 hodinách
Glykémie [mmol.l⁻¹] – standardní hodnoty	<5,3	<10,0	<8,6 (7,8)
Glykémie [mmol.l⁻¹] – hodnoty užívané pro tuto práci *	<5,5	<8,8	<7,6

* *Kriteria pro hodnocení oGTT užívaná na Gyn.-por. klinice 1. LF UK a VFN (MUDr. Moravcová).*

Ze všech uvedených metod hodnotících míru inzulínové senzitivity byl pro rozdělení těhotných do vyšetřovaných skupin použit oGTT, a míra inzulínové senzitivity v době porodu byla hodnocena pomocí HOMA, QUICKI a Mc'Auleyho indexů u skupin zdravých těhotných a s GDM kompenzovaným dietou (GDM-D). Jako nástroj posouzení míry inzulínové rezistence v době porodu i u žen užívajících ke kompenzaci GDM inzulín byly stanoveny sérové koncentrace C-peptidu.

3.4.5 Statistické zpracování výsledků

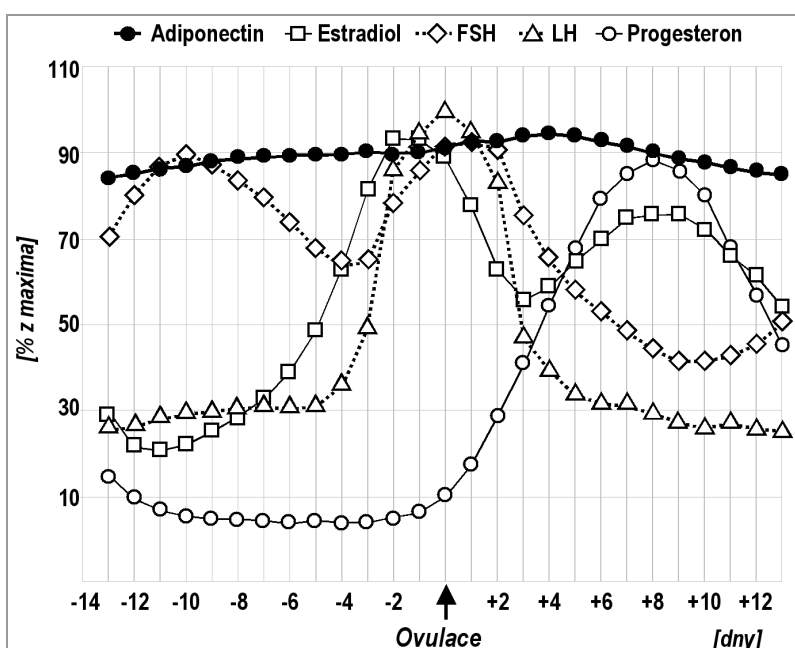
Získaná data byla hodnocena pomocí statistického programu SigmaStat. Rozdíly v jednotlivých sledovaných parametrech mezi vyšetřovanými skupinami byly vyhodnoceny pomocí One-Way ANOVA testu. Při neparametrickém rozložení dat ve vyšetřovaných souborech byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test. Pro analýzu vzájemných korelací posuzovaných parametrů napříč skupinami byl použit Spearmanův korelační test.

4 VÝSLEDKY

4.1 Charakterizace změn sérových koncentrací adiponectinu v závislosti na menstruačním cyklu

V celém souboru nevykazoval adiponectin v závislosti na fázi menstruačního cyklu ani na profilech sérových koncentrací jednotlivých pohlavních hormonů signifikantní změny sérových koncentrací (Obr. 16).

Obrázek 16. Denní průměrné sérové koncentrace adiponectinu, estradiolu, LH, FSH a progesteronu stanovené na souboru šesti žen sledovaných během menstruačního cyklu



V tomto grafickém znázornění ovulace ~ den 0; první den menstruace ~ dni -13.

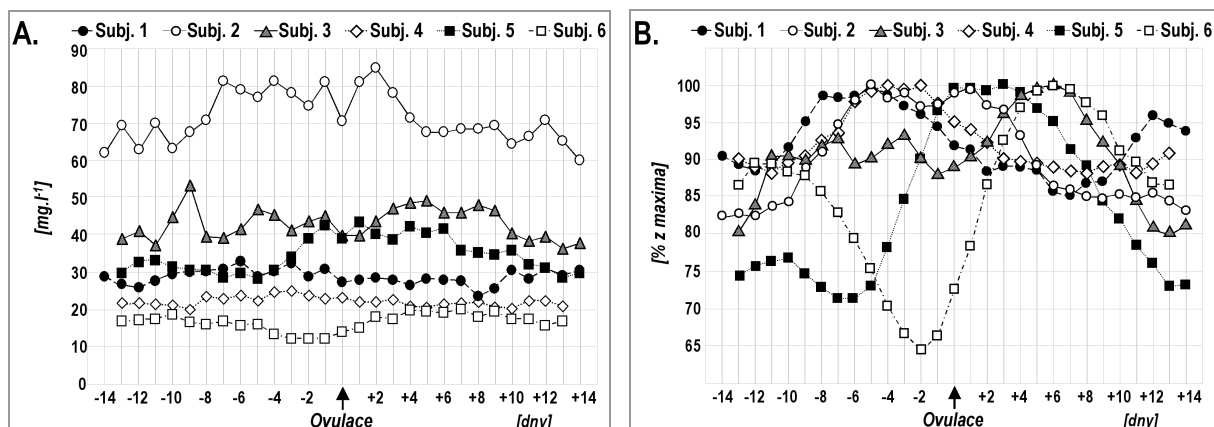
Před zavzetím individuálních hodnot sérových koncentrací sledovaných parametrů do stanovení průměru, byl u každého parametru určen klouzavý průměr z 5-ti hodnot po sobě následujících dnů menstruačního cyklu.

Hodnoty sérových koncentrací na začátku a na konci menstruačního cyklu použité pro kalkulaci klouzavých průměrů se překrývají.

Přesto u jednotlivých probandek fluktovaly sérové koncentrace adiponectinu během menstruačního cyklu poměrně výrazně (Obr. 17), a to v rozmezí 24,1% až 50,3% od individuálních průměrných měsíčních sérových koncentrací. Tyto změny však byly inkonzistentní a nesegregovaly s žádnou fází menstruačního cyklu (Tabulka 15).

Základní parametry sérových koncentrací ADIPOQ u jednotlivých probandek získané z každodenního stanovení po období celého menstruačního cyklu (průměrná hodnota, medián, minimální a maximální koncentrace) byly korelovány jak s klinickými daty (věk, výška, hmotnost a BMI), tak se získanými biochemickými parametry (aterogenní index a sérové koncentrace glukózy, inzulínu, testosteronu, prolaktinu, kortizolu, TAG, celkového, HDL i LDL cholesterolu) (Tabulka 15).

Obrázek 17. Individuální křivky sérových koncentrací adiponektinu získané z každodenních odběrů u jednotlivých probandek během celého menstruačního cyklu. **A.** Absolutní hodnoty sérových koncentrací adiponektinu [mg/l]; **B.** Relativní změny sérových koncentrací (maximální sérová koncentrace adiponektinu z celého souboru hodnot odpovídá 100% u každé ženy). Ovulace ~ den 0 menstruačního cyklu na ose x.



Sérové koncentrace ADIPOQ statisticky významně korelovaly pouze pozitivně se sérovou koncentrací kortizolu, a to minimální, maximální hodnoty, průměr i medián (všechny $R=0,94286$, $P=0,0048$). Podobná pozitivní korelace byla také mezi kortizolem a fluktuací (maximum – minimum) koncentrací adiponektinu ($R=0,8857$, $P=0,0188$). Mezi žádnou z dalších klinických ani biochemických charakteristik a adiponektinem nebyl na vyšetřovaném souboru Spearmanovou korelací zjištěn statisticky významný vztah.

Tabulka 15. Sérové koncentrace sledovaných parametrů vyšetřovaných žen získané v prvním dni menstruačního cyklu. * Den menstruačního cyklu (den 0 = ovulace)** Fluktuace adiponektinu během menstruačního cyklu u jednotlivých žen vyjádřená jako rozmezí: minimum (%) – maximum (%); kdy 100% tvoří průměrná měsíční koncentrace adiponektinu.

Parametr	Subjekt číslo					
	1	2	3	4	5	6
Glukóza [mmol.l ⁻¹]	4,7	5,0	4,4	4,3	4,8	4,5
Inzulín [mIU.l ⁻¹]	2,6	4,5	4,4	2,7	10,3	5,3
Testosteron [nmol.l ⁻¹]	2,6	3,6	4,5	1,1	2,7	3,0
Prolaktin [μg.l ⁻¹]	8,6	22,2	11,9	17,5	14,2	11,9
Kortizol [nmol.l ⁻¹]	475,2	607,3	480,6	443,3	488,3	406,1
Cholesterol [mmol.l ⁻¹]	5,0	4,4	5,4	3,7	4,1	5,7
HDL cholesterol [mmol.l ⁻¹]	2,0	1,7	2,0	1,9	1,8	2,2
LDL cholesterol [mmol.l ⁻¹]	2,5	2,2	3,0	1,5	2,0	3,1
Triacylglyceroly [mmol.l ⁻¹]	0,9	1,0	0,8	0,8	0,7	1,0
Aterogenní index	1,5	1,5	1,7	1,0	1,3	1,6
Sérové koncentrace adiponektinu ve sledovaném období jednoho menstruačního cyklu						
ADIPOQ průměr [mg.l ⁻¹]	28,2	71,7	42,6	21,6	34,1	15,9
ADIPOQ medián [mg.l ⁻¹]	28,3	70,4	42,2	21,5	33,1	16,1
ADIPOQ min. [mg.l ⁻¹] (ve dni)*	23,0 (+8)	59,6 (+14)	35,8 (+13)	19,3 (-9)	27,6 (-5)	11,4 (-2)
ADIPOQ max. [mg.l ⁻¹] (ve dni)*	32,5 (-6)	84,9 (+2)	53,0 (-9)	24,5 (-3)	43,0 (+1)	19,4 (+7)
Fluktuace ADIPOQ [%]**	82-115	83-118	84-124	89-113	81-126	72-122

Referenční rozmezí sérových koncentrací u ovulujících žen: glukóza [4,2 – 6,0 mmol.l⁻¹]; inzulín [2,5 – 24,0 mIU.l⁻¹]; testosteron [0,3 – 5,8 nmol.l⁻¹]; prolaktin [3,6 – 13,4 μg.l⁻¹]; kortizol [118 – 618 nmol.l⁻¹]; cholesterol [3,1 – 5,2 mmol.l⁻¹]; HDL cholesterol [1,3 – 2,3 mmol.l⁻¹]; LDL cholesterol [1,5 – 4,2 mmol.l⁻¹]; triacylglyceroly [0,68 – 1,69 mmol.l⁻¹]; aterogenní index [0 – 3,0].

4.2 Charakterizace expresního profilu tukové tkáně a placenty ve vztahu ke gestačnímu diabetu mellitu -expresní arrays

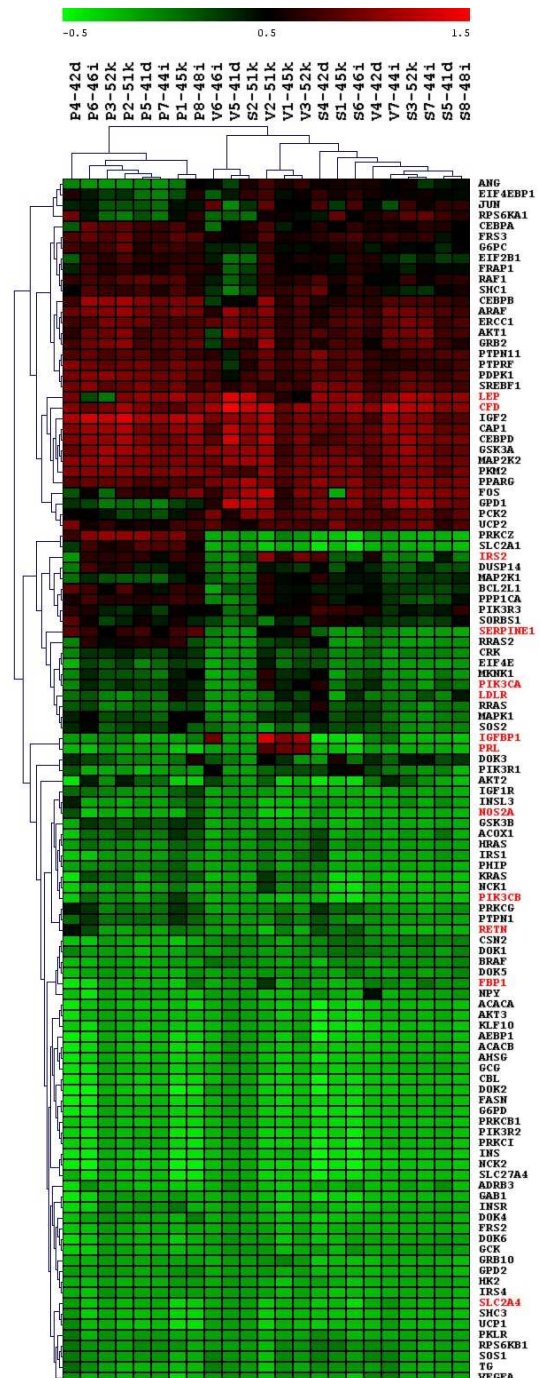
Celkem bylo vyšetřeno 8 žen: 3 kontroly (k), 3 ženy s GDM na inzulínu (i) a 2 s GDM kompenzovaným dietou (d), od každé subkutánní (S) i viscerální (V) tuková tkáň a placenta (P) (Obr. 19.).

Aby bylo možné pro iniciální představu popsat globální charakteristiky genové exprese v námi analyzovaných tkáních a jejich tkáňově specifické rozdíly, byla provedena clusterová analýza všech vyšetřených vzorků (Obr. 18). Z celkového množství 112 analyzovaných genů se bez ohledu na tkáňovou specifitu expimovalo 78 genů. U zbývajících 34 byla míra exprese pod detekčním limitem prováděných arrayů.

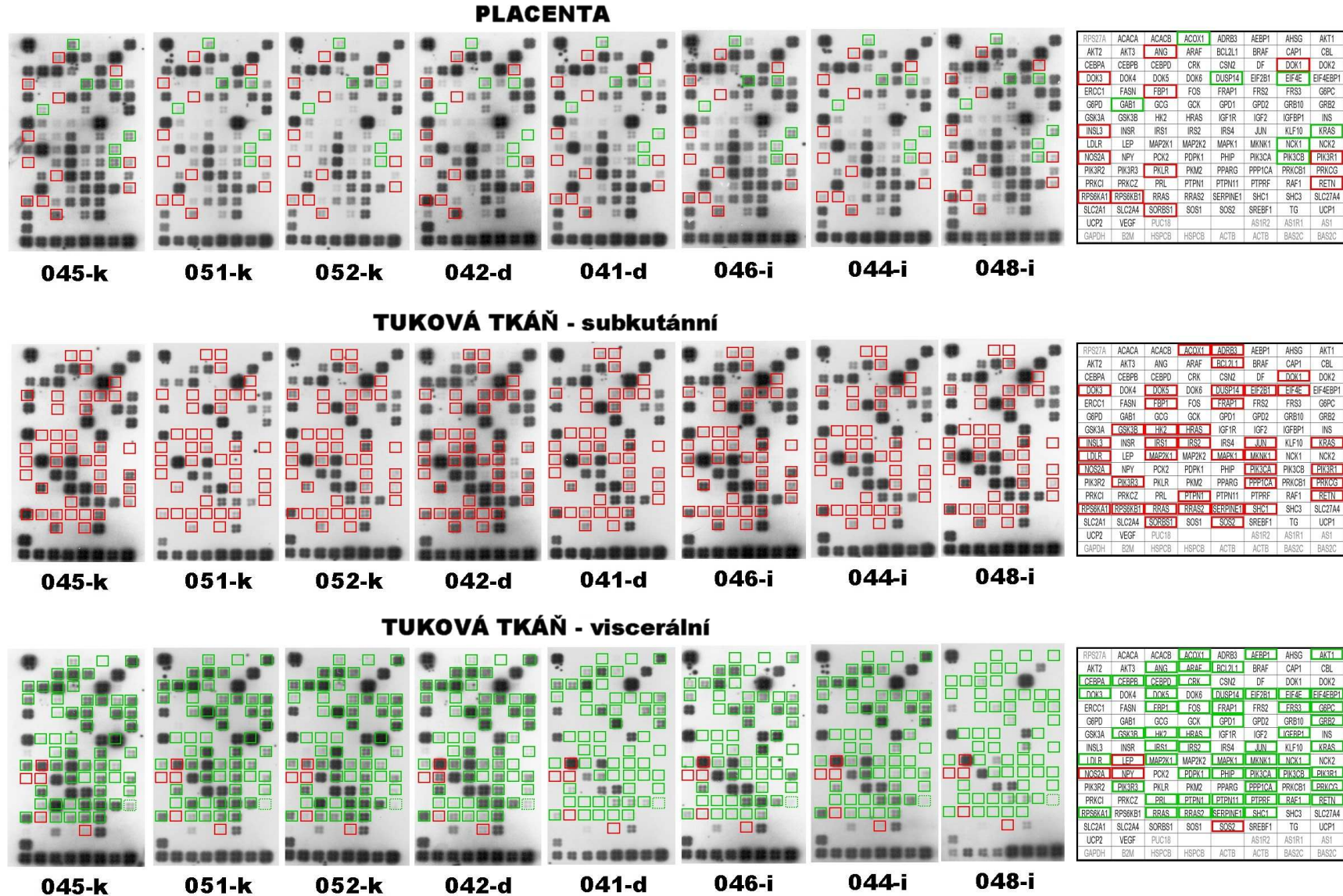
Na první pohled je patrné, že od obou, expresně si navzájem relativně podobných tukových tkání (V a S), se výrazně odlišuje placenta (P). V placentární tkáni byla SAM analýzou zjištěna snížená exprese PCK2, ANG a GPD1, naopak signifikantně vyšší exprese oproti tukovým tkáním byla nalezena u genů PRKCZ, SLC2A1 (GLUT1), SERPINE 1 (PAI1), RRAS2, GSK3B, BCL2L1, PPP1CA, CEBPB, G6PC, IGF2, CRK, SOS2 a DUSP14 (MAP-kinase phosphatase 6).

Obrázek 18. Clustergram pro komparaci expresního profilu genů zúčastněných v regulaci inzulínové signalizace v jednotlivých vzorcích analyzovaných tkání. Červeně označené názvy genů byly zahrnuty v souboru kvantifikace genové exprese pomocí qPCR. (k-kontrola; d-DM kompenzovaný dietou; i- DM kompenzovaný inzulínem)

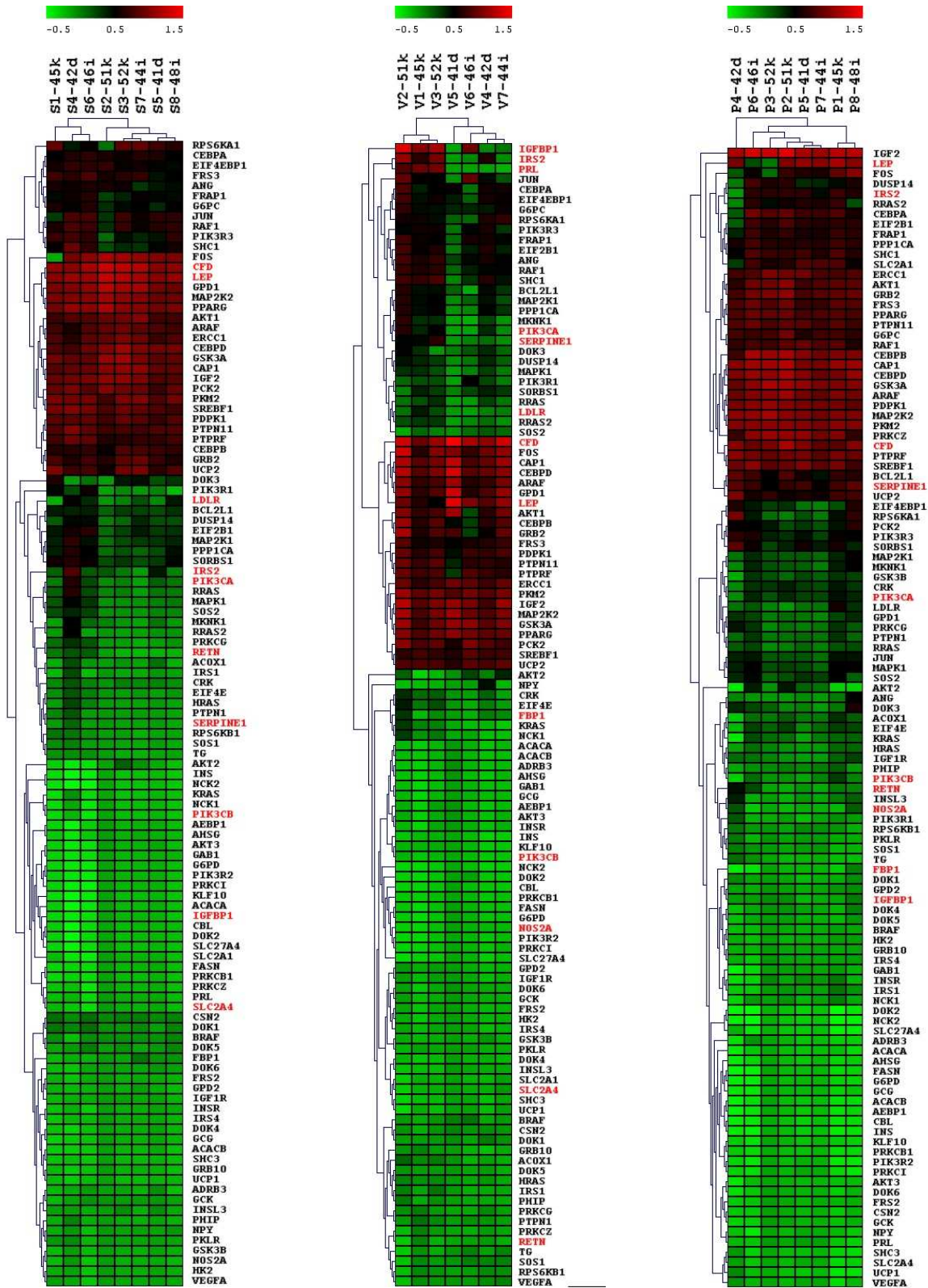
Array provedená ze vzorku cRNA V8-048i nebyla technicky dostatečně kvalitní pro vyhodnocení exprese (slabý signál), a proto byla z dalšího zpracování vyřazena.



Obrázek 19. Sumární obrázek se všemi vyšetřovanými arrays - autoradiografická data. Míra iexprese odpovídá intenzitě jednotlivých čtveřic spotů. Ve čtveřicích jsou vyznačeny geny s rozdílnou expresí těhotných s GDM vůči kontrolám ($\Delta > 1.2x$). Červeně = upregulace, zeleně = downregulace. Vzorek 048-i (poslední) nebyl z důvodů nízké intenzity signálu zařazen do dalšího zpracování.



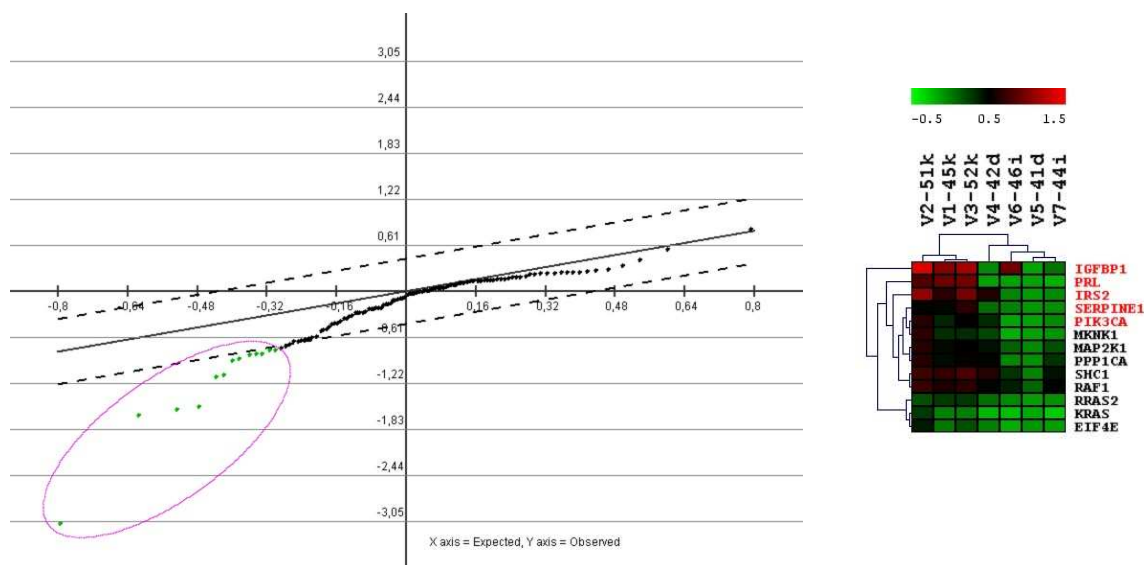
Obrázek 20. Clusterová analýza (TM4-MeV, euclidean distance and average linkage clustering) jednotlivých vyšetřovaných tkáňových subsouborů – subkutánní (vlevo), viscerální (uprostřed) tuková tkáň a placenta (vpravo). Červeně označené názvy genů byly zahrnuty v souboru kvantifikace genové exprese pomocí qPCR. (k-kontrola; d-DM kompenzovaný dietou; i- DM kompenzovaný inzulínem)



Pozn. Rozmezí exprese -0.5 (zeleně) = nejméně exprimované geny, 0.5 (černě) = střední exprese (medián) a 1.5 (červeně) = nejvíce exprimované geny v tomto i následujících obrázcích vyjadřuje míru intenzity jednotlivých spotů v arrayi normalizované na „globální“ pozadí.

Změny v genové expresi ve vztahu ke GDM byly analyzovány zvláště v jednotlivých tkáních (S, V, P; Obr. 20). Třebaže výsledky analýzy exprese pomocí arrayí je nutno brát s ohledem na omezený počet vyšetřovaných vzorků opatrně, lze si povšimnout, že zatímco v případě viscerální tukové tkáně (Obr. 20, uprostřed) došlo k seskupení kontrol (V1-V3) do samostatného clusteru odděleného od dalšího clusteru obsahujícího vzorky od žen s GDM kompenzovaných dietou nebo inzulinoterapií, není tento výstup patrný při analýze vzorků subkutánní tukové tkáně (Obr. 20, vlevo) ani placenty (Obr. 20, vpravo). S ohledem na tento výsledek není překvapením, že následně provedená SAM analýza v GEA Suite prokázala statisticky nesignifikantní změny u rodiček s GDM (dohromady na inzulinu i na dietě) v porovnání s kontrolami ve vzorcích subkutánní tkáně a placenty. Pouze v případě vzorků viscerální tukové tkáně (Obr. 21) bylo SAM analýzou identifikováno 13 vzorků s negativní korelací exprese (relativní snížení u žen s GDM): IGFBP1, PRL, IRS2, SERPINE1, PIK3CA, MKNK1, MAP2K1, PPP1CA, SHC1, RAF1, RRAS2, KRAS, EIF4E.

Obrázek 21. *SAM analýza (Significance Analysis of Microarrays, Tusher method) s vyšetřovanými vzorky RNA z viscerální (V) tukové tkáně. SMA analýzou (Median number of false positive genes = 0.0000) bylo identifikováno 13 genů (vlevo, ohraničeny elipsou), jejichž clustergram je znázorněn vpravo.*



SAM analýza je vhodným nástrojem pro určení statistické významnosti změny genové exprese ve srovnávaných skupinách. Její nevýhodou je ovšem nemožnost kvantitativního vyjádření míry změny genové exprese v násobcích vzhledem ke kontrolám. Z tohoto důvodu jsme pro analýzu diferenciálně exprimovaných genů použili nástroje ScatterPlot z GEASuite,

který poměruje normalizovaná data exprese ve sledovaných souborech vůči sobě navzájem (např. kontroly vs. těhotné s GDM na dietě). Výsledky analýzy pomocí Scatterplotu jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16. *Přehled genů s rozdílnou genovou expresí u těhotných s GDM vůči kontrolám. Kvantifikace byla provedena pomocí ScatterPlotu.*

<i>Placenta</i>		<i>Viscerální tuk</i>		<i>Subkutánní tuk</i>	
Gen	Poměr exprese vůči kontrole ⁺	Gen	Poměr exprese vůči kontrole ⁺	Gen	Poměr exprese vůči kontrole ⁺
NOS2A*	2,88	NPY	3,82	KRAS	18,96
INSL3	2,50	NOS2A*	2,32	IRS1	3,73
RETN*	2,15	RETN*	1,70	RRAS2	3,53
RPS6KA1	1,98	SOS2	1,63	ACOX1	3,46
FBP1	1,94	RPS6KB1	1,53	LDLR*	3,15
ANG	1,91	KRAS	0,01	FBP1*	3,08
PKLR	1,82	IGFBP1*	0,02	ADRB3	2,58
DOK3	1,72	NCK1	0,02	IRS2*	2,22
KRAS	0,28	PRL*	0,03		
PIK3CB*	0,48	MKNK1	0,03		
EIF4E	0,51	PIK3CA*	0,04		
NCK1	0,51	IRS2*	0,19		
ACOX1	0,57	SERPINE1*	0,27		
		PIK3CB*	0,32		

Pozn. ⁺Expresse kontroly = 1. *Geny vybrané k následnému vyšetření exprese pomocí qPCR. Hodnoty exprese u genů se zvýšenou expresí jsou označeny červeně, se sníženou zeleně. Modře označené názvy genů symbolizují ty, u kterých v individuálních případech nepřesáhl signál míry exprese detekční limit (tzv. absent calls).

Z výsledků kvalitativních a kvantitativních analýz arrays byly vybrány geny s rozdílnou expresí v jednotlivých tkáních u kontrol a pacientek s GDM pro qPCR kvantifikaci na rozšířeném souboru.

4.3 Charakterizace expresního profilu tukové tkáně a placenty ve vztahu ke gestačnímu diabetu mellitu - qPCR

Kritériem pro výběr vhodných genů k qPCR vyšetřením byla jejich předpokládaná spojitost s adipokinovou signalizací nebo stavem inzulínové rezistence. Na základě výsledků expresních arrays bylo vybráno dalších 10 genů (Tab. 17) vykazujících výrazné změny exprese ve

vyšetřovaných tkáních. Tři geny testované v arrays (CFD, LEP a RETN) byly vybrány přesto, že nevykazovaly rozdíly v genové expresi. Jedná se o typické produkty tukové tkáně.

Tabulka 17. Přehled genů, které byly vybrány pro vyšetření pomocí qPCR v jednotlivých typech tkání. Subkutánní (s.c. tuk) a viscerální (visc. tuk) tuková tkáň. + = exprese byla vyšetřena metodou qPCR; - = exprese genu metodou qPCR v dané tkáni vyšetřena nebyla. Modře jsou znázorněny HK geny, červeně geny, jejichž exprese byla hodnocena též metodou expresních arrays.

Gen - symbol	Gen – název (používaný alternativní symbol)	S.c. tuk	Visc. tuk	Placenta
B2M	β-2-mikroglobulin	+	+	+
GAPDH	Glyceraldehydfosfátdehydrogenáza	+	+	+
PBGD	Porfobilinogensyntáza	+	+	+
ADIPOQ	Adiponectin	+	+	+
ADIPOR1	Adiponectinový receptor 1	+	+	+
ADIPOR2	Adiponectinový receptor 2	+	+	+
CD68	CD68	+	+	+
CFD	Adipsin (DF)	+	+	+
CSH1	Placentární laktogen (hPL)	-	-	+
ESR1	Estrogenní receptor 1 (ESRα)	+	+	+
ESR2	Estrogenní receptor 2 (ESRβ)	+	+	+
FBP1	Fruktóza-1,6-bisfosfatáza 1	+	+	+
GLUT3	Glukózový transportér 3	-	-	+
GLUT4	Glukózový transportér 4 (SLC2A4)	+	+	+
IDE	Inzulináza	+	+	+
IGFBP1	IGF vazebný protein 1	-	+	+
IL-6	Interleukin 6	+	+	+
IL-8	Interleukin 8	+	+	+
IRS2	Inzulín-receptor substrát 2	+	+	+
LIPE	Hormon senitivní lipáza (HSL)	+	+	+
LEP	Leptin	+	+	+
LDLR	LDL receptor	+	+	-
NOS2A	Inducibilní NO syntáza 2A	-	+	+
PAI1	Inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (SERPINE1)	+	+	+
PIK3CA	Fosfatidylinositol-3-kináza, katalytická podjednotka α	+	+	+
PIK3CB	Fosfatidylinositol-3-kináza, katalytická podjednotka β	+	+	+
PPAR-A	Proliferátory peroxisomu aktivovaný receptor α	+	+	-
PRL	Prolaktin	-	+	-
RETN	Resistin	+	+	+
TNF-A	Tumor nekrotizující faktor (TNFα)	+	+	+

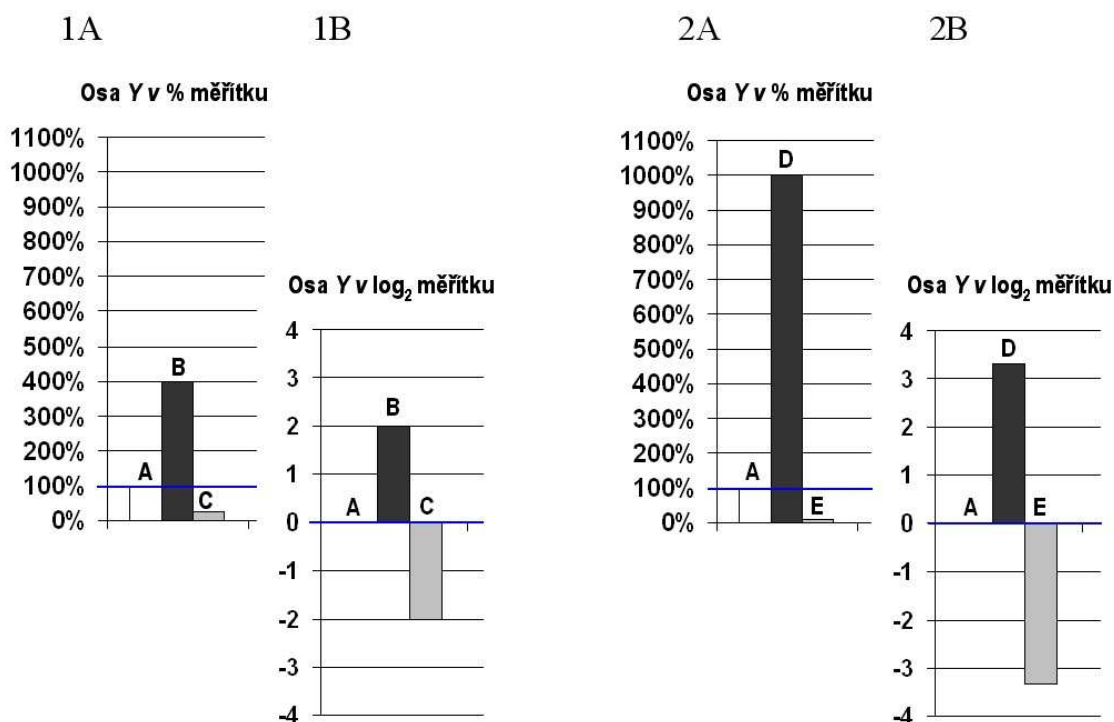
Na celé studovaném souboru těhotných (tedy 13 zdravých těhotných kontrol a 14 těhotných s GDM – 5 kompenzovaných dietou a 9 inzulinem) byla vyšetřena exprese vybraných genů na úrovni mRNA v placentě, subkutánní a viscerální tukové tkáni.

Pro vyhodnocení míry exprese sledovaných genů v jednotlivých typech tkání byla použita normalizace pouze vůči jednomu HK genu, a to vůči B2M. Exprese vybraného HK genu byla v tomto případě hodnocení považována za = 1.

Pro přesnější zhodnocení dynamiky změn exprese v jednotlivých tkáních mezi skupinami těhotných s GDM a zdravými těhotnými kontrolami byla provedena normalizace podle 3 HK genů, a to B2M, GAPDH a PBGD.

Při hodnocení dynamiky změn byla po normalizaci považována za = 1 exprese sledovaného genu v kontrolní skupině. Pro grafické znázornění dynamiky pozorovaných změn je použito semilogaritmických grafů, kdy hodnoty na ose Y jsou vyneseny v logaritmickém měřítku při základu 2 [\log_2]. V tomto grafickém zobrazení je exprese sledovaného genu v dané tkáni v kontrolní skupině = 0 ($\log_2 1 = 0$), zvýšení exprese u těhotných s GDM je zobrazeno v kladné části osy Y a při sížení exprese jsou hodnoty v záporné části osy Y.

Obrázek 22. Dva možné způsoby zobrazení dynamiky změn genové exprese. Vzorek A = kontrola, jeho exprese odpovídá 1. Expresse ve vzorku B je 4x vyšší, vzorku C 4x nižší, vzorku D 10x vyšší a vzorku E 10x nižší, než exprese v kontrolním vzorku A. Expresse kontroly, tedy vzorku A, proti kterému jsou expresse ostatních vzorků hodnoceny, je v grafu zvýrazněna modrou čarou. 1A a 2A část odpovídá zobrazení v %, kdy kontrola tvoří 100%; 1B a 2B odpovídá semilogaritmickému zobrazení (osa Y je v \log_2 měřítku).



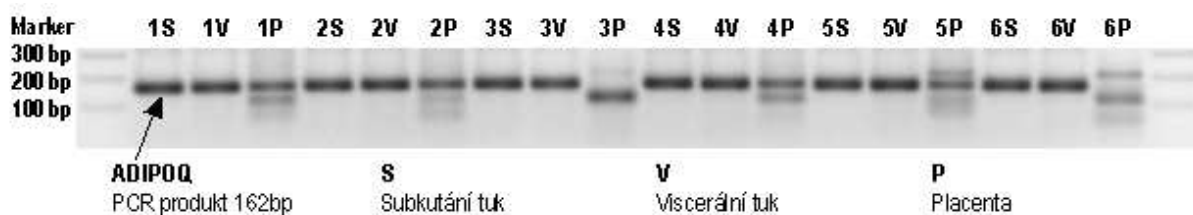
Toto grafické zobrazení je při hodnocení dynamiky změn exprese vhodnější, než % vyjadřování exprese vyšetřovaných skupin proti skupině kontrolní (100%), protože velikost sloupce v grafu je shodná pro stejně velkou změnu ve smyslu up- i down-regulace, čehož není možno v % vyjádření míry exprese dosáhnout (Obr. 22).

Jsou-li změny exprese v rozsahu řádů, je vhodné použít pro hodnoty osy *Y* dekadického logaritmu namísto zde používaného logaritmu při základu 2.

4.3.1 Expese adipokinů

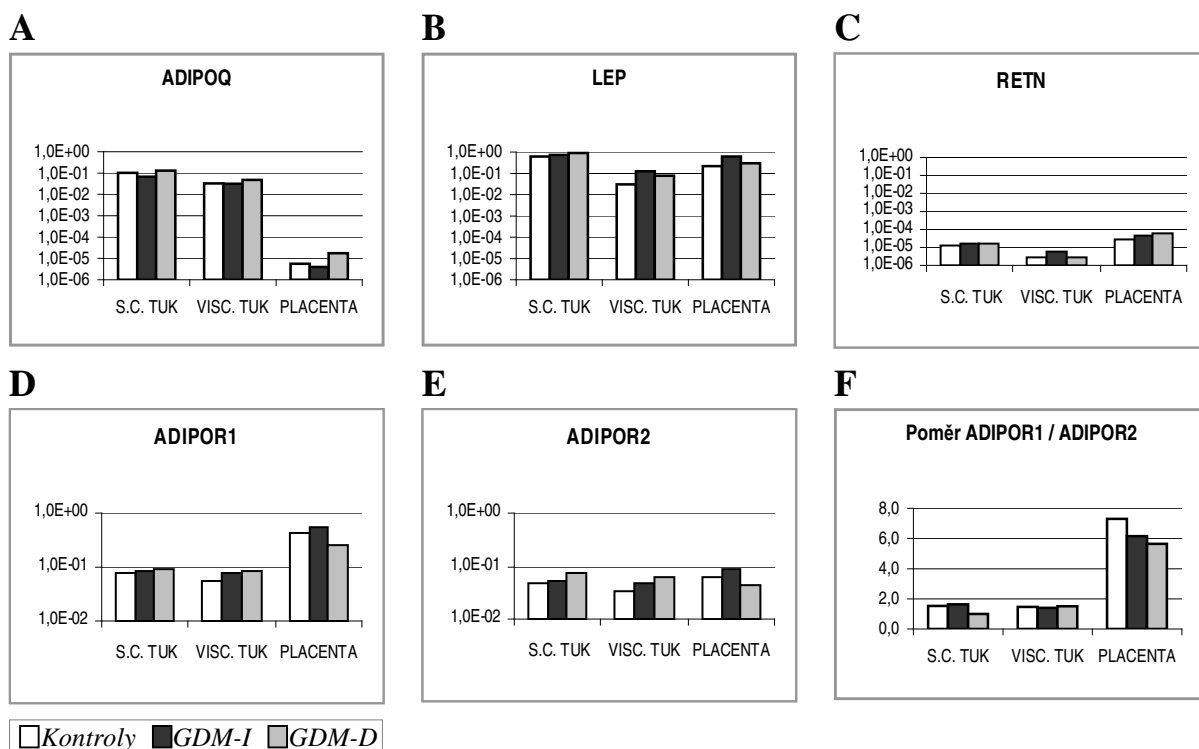
Bylo stanoveno, že geny leptin a resistin jsou exprimovány nejen oběma druhy tukové tkáně, ale hojně také placentou. Přičemž placentární exprese leptinu a resistinu řádově odpovídá expresi těchto adipokinů v s.c. tuku a nejméně jsou tyto působky exprimovány tukovou tkání viscerální. Resistin je exprimován přibližně 10^4 - 10^5 x méně než leptin. (Obr. 24. B, C) Expese adiponektinu v subkutánní a viscerální tukové tkáni je řádově srovnatelná (Obr. 24. A), ovšem nebylo možno prokazatelně potvrdit expresi nemodifikované mRNA pro adiponektin ve tkáni placentární (Obr. 23.), a proto dále v placentě nebyla dynamika změn exprese adiponektinu mezi skupinami žen s GDM a kontrolním souborem hodnocena.

Obrázek 23. Gelová elektroforéza PCR produktů na příkladu qPCR amplifikace adiponektinu z různých tkání šesti osob (stejná osoba označena shodným číslem před symbolem tkáně). V subkutánní i ve viscerální tukové tkáni vznikl pouze 1 specifický PCR produkt, ovšem při amplifikaci templátu z placentární tkáně vznikaly bez ohledu na přítomnost či absenci GDM u testovaných žen za stejných reakčních podmínek se stejnými primery také jiné PCR produkty, a to delší i kratší, než regulérní ADIPOQ PCR produkt.



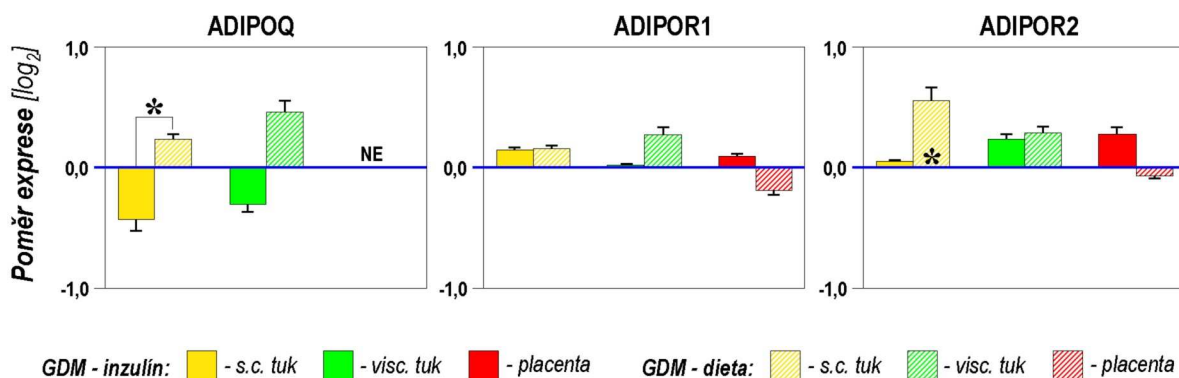
Expese mRNA pro adiponektinové receptory je ve všech vyšetřovaných tkáních vyšší pro ADIPOR1 než pro ADIPOR2 (Obr. 24. D, E, F), přičemž nejvýraznější je rozdíl exprese obou receptorů v placentě (Obr. 24. F), ve které se poměr exprese ADIPOR1 proti ADIPOR2 pohyboval v rozmezí 5,6 – 7,3 (nejnižší poměr exprese u GDM-D, střední u GDM-I a nejvyšší u kontrol, rozdíly mezi jednotlivými skupinami nebyly statisticky signifikantní).

Obrázek 24. Poměr průměrné exprese sledovaných adipokinů a jejich receptorů vůči B2M v jednotlivých skupinách a v různých typech vyšetřovaných tkání (A-E) a poměr exprese dvou typů receptoru pro adiponectin (F). A adiponectin; B leptin; C resistin; D adiponectinový receptor 1; E adiponectinový receptor 2. Osa y je v log měřítku. Expresa B2M = 1.



Při hodnocení dynamiky změn exprese adiponectinu v s.c. a visc. tukové tkáni nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly exprese u těhotných s GDM proti kontrolám (Obr. 25, Tab. 18). Byla však >1,5x statisticky významně snižená exprese ADIPOQ u GDM-I proti GDM-D ($P=0,005$).

Obrázek 25. Dynamika změn exprese genů pro adiponectin a jeho receptory. Expresa sledovaného genu v kontrolní skupině pro každou vyšetřovanou tkáň = 1, tj. v grafu ~ 0 (znázorněno modře), geny up-regulované jsou na ose y vyneseny v kladných hodnotách, geny down-regulované jsou v hodnotách záporných. * $P<0,05$. NE = nebylo hodnoceno.



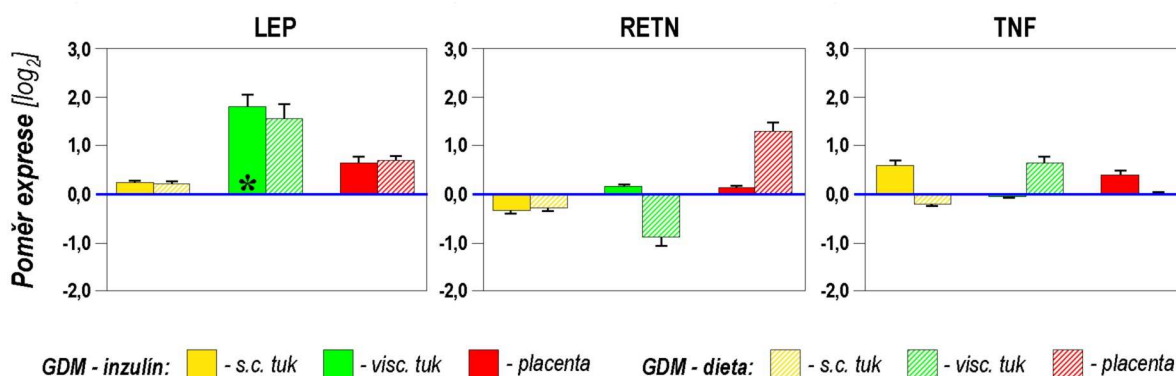
V s.c. tuku byla u GDM-D 1,47x zvýšená exprese ADIPOR2 ($P=0,01$), v ostatních případech se exprese receptorů pro ADIPOQ se u žen s GDM nelišila od zdravých rodiček (Tab. 18).

Tabulka 18. *Hodnoty míry exprese genů pro adiponectin a jeho receptory ve vyšetřovaných tkáních u těhotných s GDM kompenzovaným inzulinem (GDM-I) a nebo dietou (GDM-D) proti kontrolní skupině těhotných a mezi sebou navzájem. Statistická významnost sledované změny je vyjádřena hodnotou P. Míra exprese genu v kontrolní skupině je 1.*

Gen	ADIPOQ			ADIPOR1			ADIPOR2		
Skupina Tkáň	s.c. tuk	visc. tuk	s.c. tuk	visc. tuk	placenta	s.c. tuk	visc. tuk	placenta	
GDM-I vs KONTROLY									
	**								
Poměr exprese	0,741	0,810	1,106	1,011	1,068	1,038	1,179	1,214	
P=	0,072	0,575	0,468	0,958	0,680	0,746	0,395	0,182	
log ₂ poměru exprese	-0,43	-0,30	0,15	0,02	0,096	0,05	0,24	0,280	
GDM-D vs KONTROLY									
						UP			
Poměr exprese	1,178	1,380	1,114	1,213	0,876	1,470	1,224	0,950	
P=	0,431	0,488	0,523	0,424	0,480	0,010	0,431	0,799	
log ₂ poměru exprese	0,24	0,46	0,16	0,28	-0,191	0,56	0,29	-0,074	
GDM-D vs GDM-I									
	UP					**			
Poměr exprese	1,590	1,704	1,007	1,200	0,820	1,416	1,038	0,782	
P=	0,005	0,189	0,975	0,603	0,514	0,098	0,868	0,384	
log ₂ poměru exprese	0,67	0,77	0,01	0,26	-0,286	0,50	0,05	-0,355	

Expresce mRNA pro LEP byla u žen s GDM zvýšena pouze ve viscerální tukové tkáni, a to 3,49x u žen s GDM kompenzovaným na inzulinu a 2,95x u GDM kompenzovaným dietou ($P=0,015$, resp. $0,168$). Žádné další signifikantní změny exprese leptinu ani resistinu nebyly zjištěny (Obr. 26, Tab. 19), i když v expresi RETN byly ve skupině gestačních diabetiček na dietě pozorovány tendence ke změnám exprese. V této skupině byla ve viscerálním tuku exprese RETN 1,86x nižší ($P=0,066$) a v placentě 2,45x vyšší ($P=0,079$) proti zdravým kontrolám.

Obrázek 26. *Dynamika změn exprese genů pro leptin, resistin a TNF α . Exprese sledovaného genu v kontrolní skupině pro každou vyšetřovanou tkáň = 1, tj. v grafu ~ 0 (znázorněno modře), geny up-regulované jsou na ose y vyneseny v kladných hodnotách, geny down-regulované jsou v hodnotách záporných. * $P<0,05$.*



TNF α je ve všech vyšetřovaných tkáních exprimován zhruba stejně (Obr. 27), přibližně 10x více než resistin. V jeho expresi ale nebyly zaznamenány žádné signifikantní změny (Obr. 26, Tab. 20).

Tabulka 19. Hodnoty míry exprese genů pro leptin, resistin a TNF-alfa ve vyšetřovaných tkáních u těhotných s GDM kompenzovaným inzulínem (GDM-I) a nebo dietou (GDM-D) proti kontrolní skupině těhotných a mezi sebou navzájem. Statistická významnost sledované změny je vyjádřena hodnotou P. Míra exprese genu v kontrolní skupině je 1.

Gen	LEP			RETN			TNF-a		
Skupina Tkáň	s.c. tuk	visc. tuk	placenta	s.c. tuk	visc. tuk	placenta	s.c. tuk	visc. tuk	placenta
GDM-I vs KONTROLY		UP							
Poměr exprese	1,175	3,491	1,564	0,789	1,127	1,094	1,505	0,966	1,323
P=	0,411	0,015	0,561	0,624	0,703	0,774	0,356	0,903	0,442
log ₂ poměru exprese	0,23	1,80	0,646	-0,34	0,17	0,130	0,59	-0,05	0,404
GDM-D vs KONTROLY					**	**			
Poměr exprese	1,170	2,948	1,641	0,811	0,539	2,447	0,865	1,581	1,008
P=	0,548	0,168	0,527	0,642	0,066	0,079	0,810	0,218	0,990
log ₂ poměru exprese	0,23	1,56	0,715	-0,30	-0,89	1,291	-0,21	0,66	0,012
GDM-D vs GDM-I									
Poměr exprese	0,995	0,844	1,049	1,028	0,478	2,237	0,575	1,636	0,762
P=	0,976	0,768	0,961	0,968	0,174	0,179	0,400	0,266	0,630
log ₂ poměru exprese	-0,01	-0,24	0,069	0,04	-1,07	1,162	-0,80	0,71	-0,392

Expresie adiposinu, komplement faktoru D (CFD), je nejvyšší v s.c. tukové tkáni a nejnižší v placentě (Obr. 27 E), jeho exprese se u těhotných s GDM kompenzovaným dietou byla statisticky významně 2,27x vyšší ($P=0,047$) pouze v placentární tkáni, zatímco změny ve tkáních tukových nebyly významné (Obr. 29, Tab. 20).

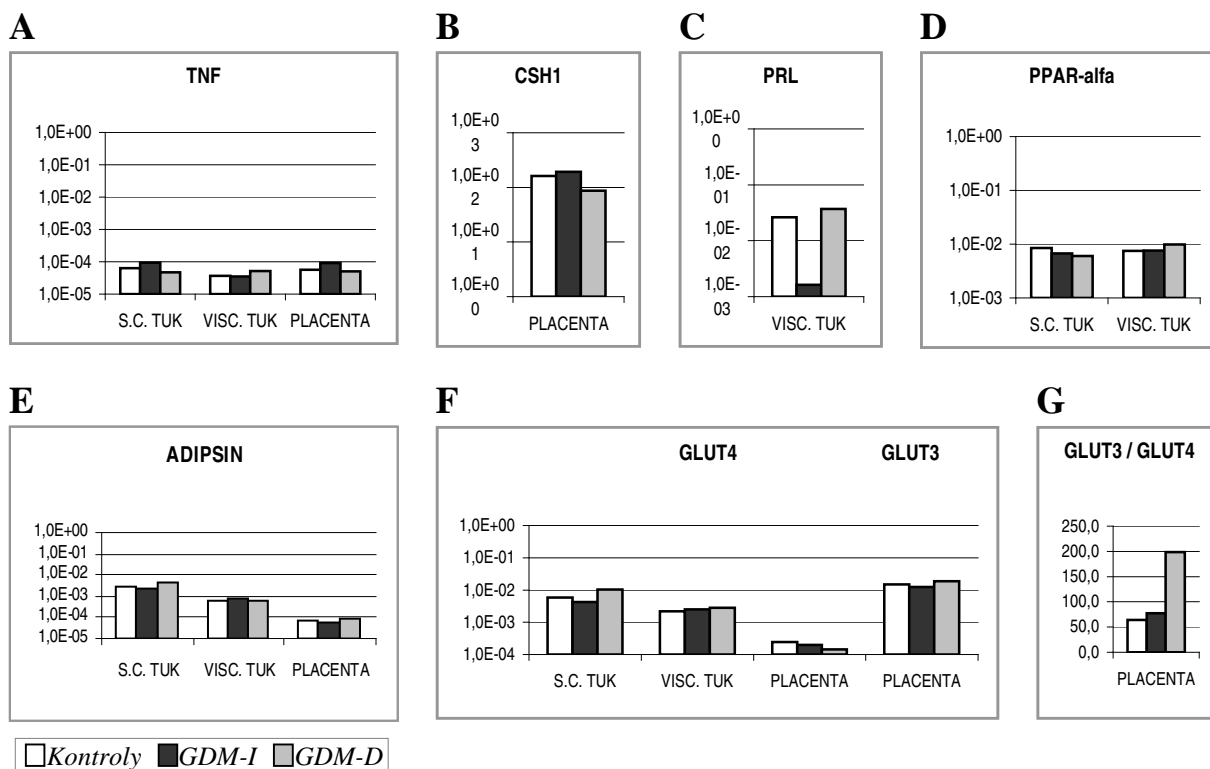
4.3.2 Expresie GLUT 3 a 4, placentárního laktogenu, prolaktinu a PPAR α

Míra genové exprese inzulín-dependentních GLUT4 transportérů byla jak v s.c.tak ve visc. tukové tkáni vyšší než ve tkáni placentární, ve které byla exprese GLUT4 transportérů řádově 10²x nižší, než exprese pro placentu charakteristických GLUT3 glukózových transportérů (Obr. 27 F, G). Změny genové exprese GLUT4 u žen s GDM proti zdravým kontrolám nebyly v žádné z vyšetřovaných tkání signifikantně odlišné, pouze v s.c. tuku byla u rodiček GDM-D jeho exprese 2,24x vyšší proti ženám s GDM-I ($P=0,031$) (Obr. 28, Tab. 20).

Expresie pro placentu specifického produktu lidského placentárního laktogenu (choriosomatotropin 1, CSH1) placentární tkáni je ve zralé placentě velmi vysoká – řádově 10²x vyšší než exprese v buňkách hojně exprimovaného HK genu B2M. Při hodnocení změn genové exprese mezi jednotlivými vyšetřovanými skupinami těhotných byla ve skupině

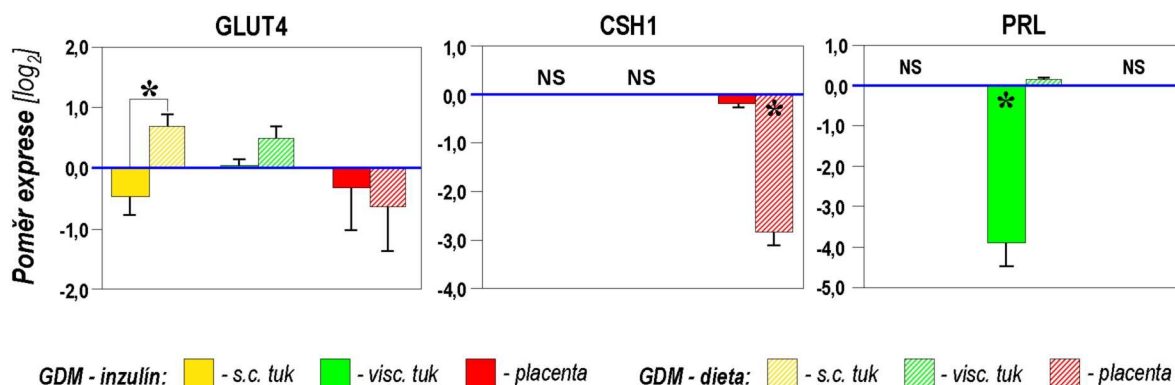
GDM-D zjištěna jeho více než 7-násobná downregulace proti zdravým kontrolám. U žen s GDM-I žádná změna exprese nalezena nebyla (Obr. 29, Tab. 20).

Obrázek 27. Poměr průměrné exprese sledovaných genů vůči B2M v jednotlivých skupinách a v různých typech vyšetřovaných tkání (A-F) a poměr exprese dvou typů glukózových transportérů v placentě (G). A TNFa; B lidský placentární laktogen (CSH1); C prolaktin; D PPARα; E adipsin; F GLUT 3 a 4. Osa y je v log měřítku (A-F). Exprese B2M = 1.



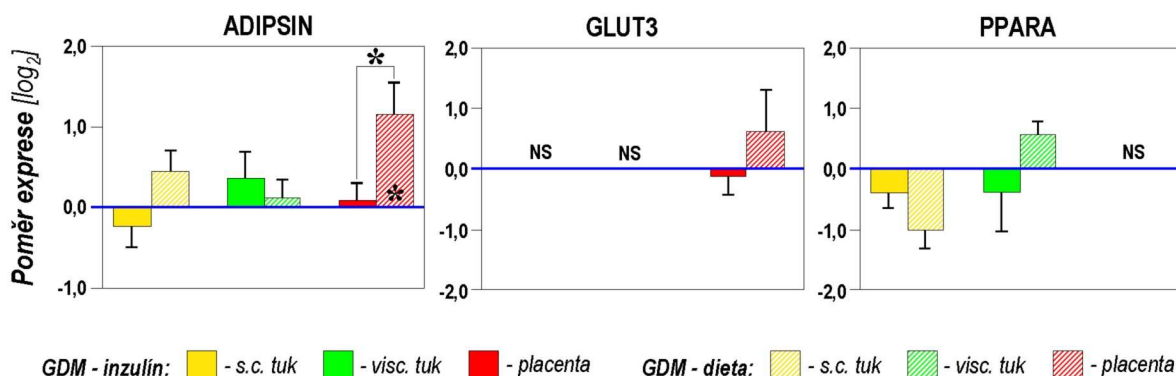
Prolaktin je ve viscerální tukové tkáni u kontrol a GDM-D produkován poměrně mohutně (Obr. 27 C), byla ovšem zjištěna jeho výrazná, statisticky signifikantní downregulace ve skupině GDM-I (14,93x, $P=0,008$) (Obr. 28, Tab. 20).

Obrázek 28. Dynamika změn exprese genů pro GLUT4, lidský placentární laktogen (CSH1) a prolaktin. Exprese sledovaného genu v kontrolní skupině pro každou vyšetřovanou tkáň = 1, tj. v grafu ~ 0 (znázorněno modře), geny up-regulované jsou na ose y vyneseny v kladných hodnotách, geny down-regulované jsou v hodnotách záporných. * $P<0,05$. NS = nebylo stanoveno..



Genová exprese PPAR α byla podobně vysoká v subkutánní i ve viscerální tukové tkáni (Obr. 27 D), avšak mezi vyšetřovanými skupinami nebyla v jeho expresi nalezena žádná signifikantní změna (Obr. 29, Tab. 20).

Obrázek 29. *Dynamika změn exprese genů pro adiposin, GLUT3 a PPAR α . Exprese sledovaného genu v kontrolní skupině pro každou vyšetřovanou tkáň = 1, tj. v grafu ~ 0 (znázorněno modře), geny up-regulované jsou na ose y vyneseny v kladných hodnotách, geny down-regulované jsou v hodnotách záporných. * P<0,05. NS = nebylo stanoveno..*



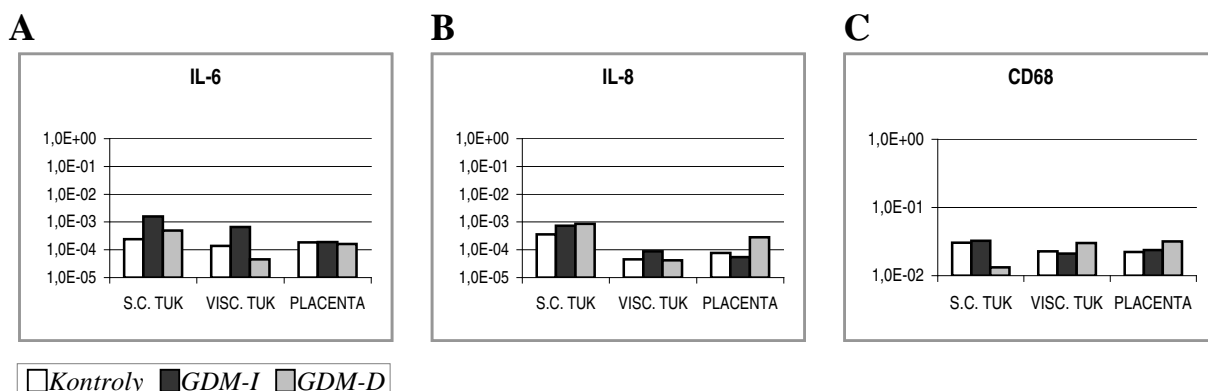
Tabulka 20. *Hodnoty míry exprese genů pro glukózové transportéry 3 a 4, PPAR-alfa, prolaktin, lidský placentární laktogen (CSH1) a adiposin (CFD) ve vyšetřovaných tkáních u těhotných s GDM kompenzovaným inzulínem (GDM-I) a nebo dietou (GDM-D) proti kontrolní skupině těhotných a mezi sebou navzájem. Statistická významnost sledované změny je vyjádřena hodnotou P. Míra exprese genu v kontrolní skupině je 1.*

Gen		GLUT4			GLUT3		PPARA		PRL	CSH1	CFD		
Skupina	Tkáň	s.c. tuk	visc. tuk	placenta	placenta	s.c. tuk	visc. tuk	visc. tuk	placenta	s.c. tuk	visc. tuk	placenta	
GDM-I vs KONTROLY													
Poměr exprese		0,716	1,042	0,802	0,911	0,759	0,760	0,067	0,871	0,851	1,297	1,066	
P=		0,126	0,915	0,333	0,638	0,336	0,419	0,008	0,789	0,514	0,345	0,819	
log ₂ poměru exprese		-0,48	0,06	-0,319	-0,135	-0,40	-0,40	-3,91	-0,200	-0,233	0,376	0,092	
GDM-D vs KONTROLY													
Poměr exprese		1,603	1,407	0,646	1,530	0,497	1,476	1,104	0,140	1,378	1,101	2,227	
P=		0,094	0,511	0,201	0,151	0,104	0,132	0,931	0,011	0,274	0,789	0,047	
log ₂ poměru exprese		0,68	0,49	-0,631	0,613	-1,01	0,56	0,14	-2,837	0,462	0,138	1,155	
GDM-D vs GDM-I													
Poměr exprese		2,238	1,349	0,805	1,680	0,655	1,943	16,591	0,161	1,619	0,848	2,089	
P=		0,031	0,604	0,502	0,086	0,340	0,331	0,056	0,083	0,164	0,626	0,036	
log ₂ poměru exprese		1,16	0,43	-0,313	0,748	-0,61	0,96	4,05	-2,638	0,695	-0,237	1,063	

4.3.3 Exprese IL-6, IL-8 a CD68

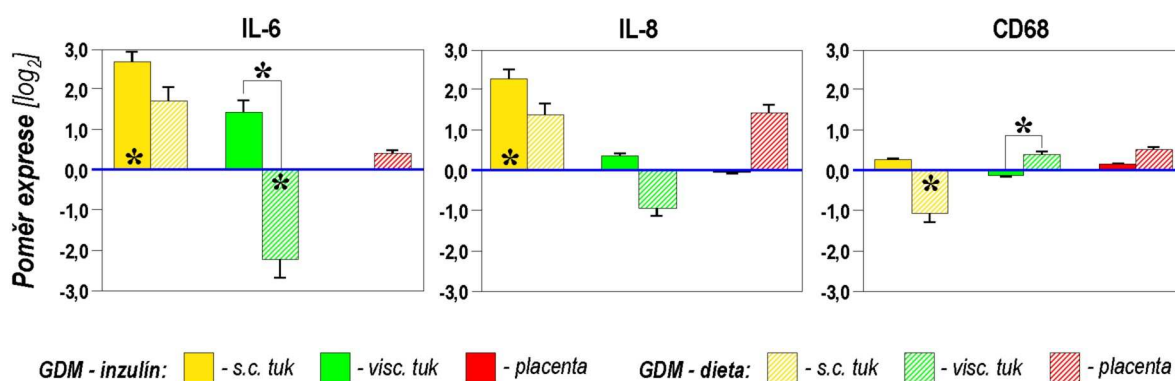
Protože u diabetu mellitu je popisován současně s inzulínovou rezistencí subklinicky probíhající chronický zánět [12], vyšetřovali jsme také expresi IL-6 a IL-8 v placentě i obou druzích tukové tkáně. Aby mohlo být posouzeno, zda je zdrojem sledovaných interleukinů skutečně tuková popřípadě placentární tkáň a ne např. imunokompetentní buňky, byla pro posouzení míry infiltrace těmito buňkami hodnocena také míra exprese pro IK buňky specifického markeru CD68.

Obrázek 30. Poměr průměrné exprese IL-6, IL-8 a CD68 vůči B2M v jednotlivých skupinách a v různých typech vyšetřovaných tkání. Osa y je v log měřítku. Exprese B2M = 1.



Z uvedených výsledků je zřejmé, že všechny vyšetřované tkáně byly relativně stejnoměrně infiltrované IK buňkami (Obr. 30 C), pouze v subkutánní tukové tkáni byla u žen s GDM kompenzovaným dietou signifikantně více než 2x nižší exprese CD68 proti kontrolám ($P=0,025$), a byl také patrný mírný, ale statisticky významný rozdíl v infiltraci viscerální tukové tkáně ve skupině GDM-D proti GDM-I (1,46x upregulace, $P=0,011$) (Obr. 31, Tab. 21).

Obrázek 31. Dynamika změn exprese genů pro IL-6, IL-8 a CD68. Exprese sledovaného genu v kontrolní skupině pro každou vyšetřovanou tkáň = 1, tj. v grafu ~ 0 (znázorněno modře), geny up-regulované jsou na ose y vyneseny v kladných hodnotách, geny down-regulované jsou v hodnotách záporných. * $P<0,05$.



V subkutánní tukové tkáni bylo u žen s GDM-I zjištěno výrazné, statisticky signifikantní zvýšení exprese proti zdravým kontrolám u IL-6 i IL-8 (6,32x, $P=0,013$, resp. 4,75x, $P=0,033$) a stejný trend – tedy zvýšení exprese obou vyšetřovaných interleukinů byl pozorován také ve skupině GDM-D, i když tam nebyly změny exprese signifikantní (Obr. 31, Tab. 21).

Tabulka 21. Hodnoty poměru exprese genů pro IL-6, IL-8 a CD68 ve vyšetřovaných tkáních u těhotných s GDM kompenzovaným inzulínem (GDM-I) a nebo dietou (GDM-D) proti kontrolní skupině těhotných a mezi sebou navzájem. Statistická významnost sledované změny je vyjádřena hodnotou P. Expresse genu v kontrolní skupině je 1.

Gen	IL-6			IL-8			CD68		
Skupina Tkáň	s.c. tuk	visc. tuk	placenta	s.c. tuk	visc. tuk	placenta	s.c. tuk	visc. tuk	placenta
GDM-I vs KONTROLY	UP			UP					
Poměr exprese	6,321	2,658	0,981	4,745	1,259	0,952	1,178	0,893	1,100
P=	0,013	0,102	0,933	0,033	0,599	0,919	0,546	0,270	0,583
log ₂ poměru exprese	2,66	1,41	-0,028	2,25	0,33	-0,071	0,24	-0,16	0,137
GDM-D vs KONTROLY		DOWN					DOWN		
Poměr exprese	3,254	0,211	1,328	2,559	0,514	2,645	0,467	1,300	1,406
P=	0,148	0,029	0,243	0,392	0,332	0,187	0,025	0,115	0,157
log ₂ poměru exprese	1,70	-2,24	0,410	1,36	-0,96	1,403	-1,10	0,38	0,491
GDM-D vs GDM-I		DOWN			**		**	UP	
Poměr exprese	0,515	0,079	1,354	0,539	0,408	2,778	0,397	1,457	1,279
P=	0,371	0,004	0,211	0,523	0,068	0,267	0,055	0,011	0,291
log ₂ poměru exprese	-0,96	-3,65	0,437	-0,89	-1,29	1,474	-1,33	0,54	0,355

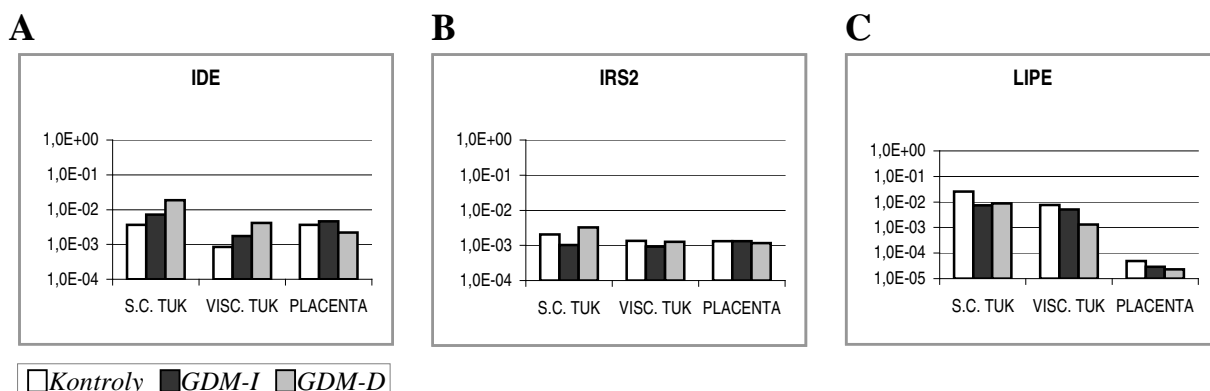
Ve viscerální tukové tkáni byla naopak ve skupině GDM-D exprese obou interleukinů snížena (Obr. 31, Tab. 21), i když statisticky významný byl tento pokles pouze v případě IL-6 ($P=0,029$). Naopak u žen s GDM-I měla exprese IL-6 ve visc. tuku spíše tendenci být vůči kontrolám zvýšená (Obr. 31, Tab. 21).

V placentě nebyly v expresi obou interleukinů nalezeny žádné významné rozdíly (Obr. 31, Tab. 21).

4.3.4 Expresse inzulinázy, IRS2 a hormon senzitivní lipázy

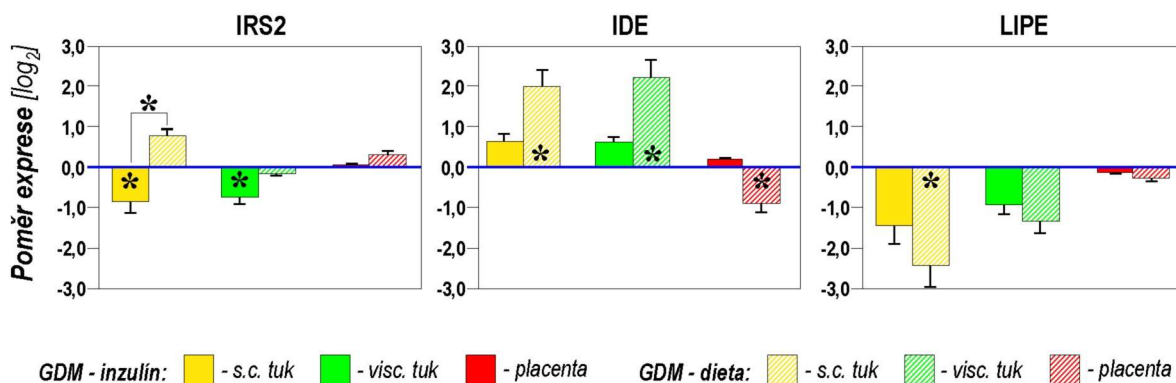
Inzulináza jako hlavní inzulín-degradující enzym byla exprimována ve všech třech vyšetřovaných tkáních (Obr. 32). U pacientek s GDM-I nebyly proti kontrolám zaznamenány žádné signifikantní změny exprese IDE (Obr. 33, Tab. 22), naopak její exprese se velmi výrazně měnila ve všech tkáních v podskupině žen s GDM-D.

Obrázek 32. Poměr průměrné exprese inzulinázy (IDE), IRS2 a hormon senzitivní lipázy (LIPE) vůči B2M v jednotlivých skupinách a v různých typech vyšetřovaných tkání. Osa y je v log měřítku. Expresse B2M = 1.



V souboru GDM-D byla proti zdravým kontrolám signifikantně zvýšena jak v tukové tkáni subkutánní (3,96x, $P=0,048$), tak ve viscerální (4,62x, $P=0,002$). Naopak v placentě byla exprese IDE v této podskupině těhotných s GDM 1,87x snížena ($P=0,047$) (Obr. 33, Tab22).

Obrázek 33. *Dynamika změn exprese genů pro IRS2, inzulinázu (IDE) a hormon senzitivní lipázu (LIPE). Expresse sledovaného genu v kontrolní skupině pro každou vyšetřovanou tkáň = 1, tj. v grafu ~ 0 (znázorněno modře), geny up-regulované jsou na ose y vyneseny v kladných hodnotách, geny down-regulované jsou v hodnotách záporných. * $P<0,05$.*



Genová exprese substrátu inzulinového receptoru 2 (IRS2) byla ve skupině GDM-I významně snížena v subkutánní i viscerální tukové tkáni (1,82x, $P=0,018$; resp. 1,7x, $P=0,016$) proti zdravým kontrolám, zatímco v placentě jeho exprese existencí GDM ovlivněna nebyla (Obr. 33, Tab. 22). Expresse IRS2 v souboru s GDM-D ve visc. tukové tkáni se neměnila, naopak s.c. tuku byl naznačen trend ke zvýšení exprese (1,68x, $P=0,076$) proti kontrolám a dinifikantě vyšší byla exprese IRS2 v s.c. tuku proti skupině těhotných s GDM kompenzovaným inzulinem ($>3x$, $P=0,001$) (Obr. 33, Tab. 22).

Tabulka 22. *Hodnoty poměru exprese genů pro IRS2, inzulinázu a hormon senzitivní lipázu ve vyšetřovaných tkáních u těhotných s GDM kompenzovaným inzulinem (GDM-I) a nebo dietou (GDM-D) proti kontrolní skupině těhotných a mezi sebou navzájem. Statistická významnost sledované změny je vyjádřena hodnotou P. Míra exprese genu v kontrolní skupině je 1.*

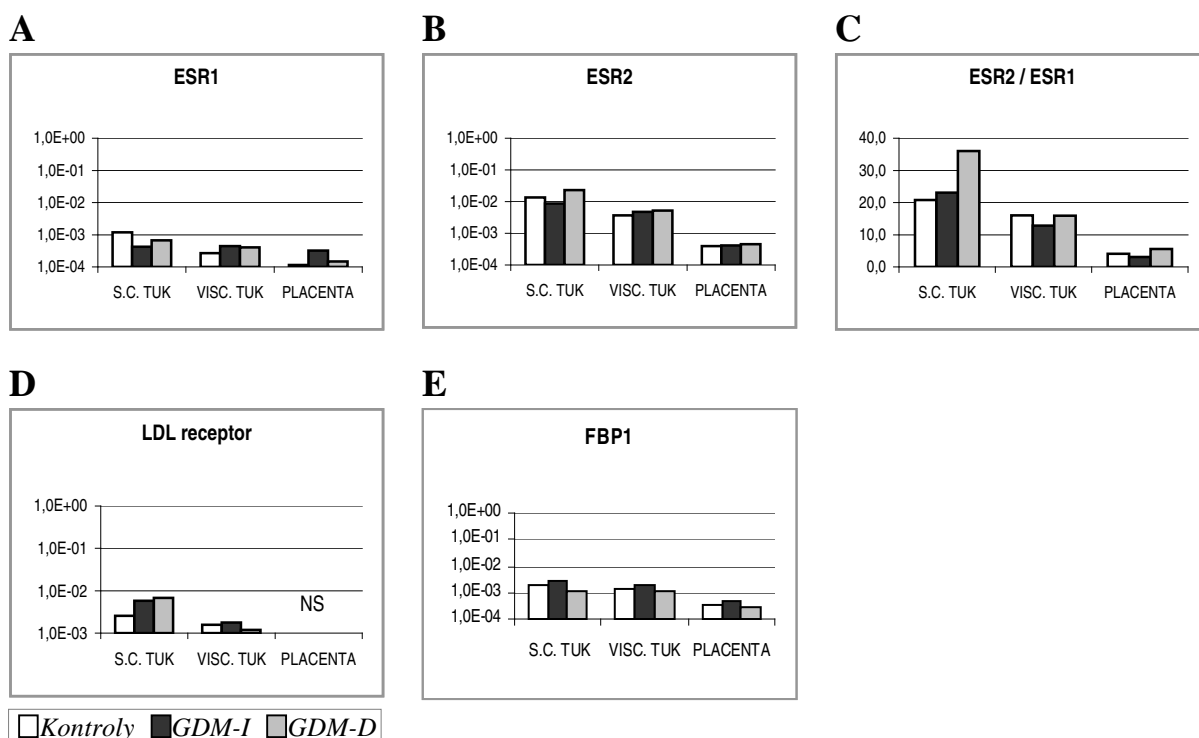
Gen	Skupina	Tkáň	IRS2			IDE			LIPE		
			s.c. tuk	visc. tuk	placenta	s.c. tuk	visc. tuk	placenta	s.c. tuk	visc. tuk	placenta
GDM-I vs KONTROLY											
Poměr exprese			DOWN	DOWN							
$P=$			0,551	0,594	1,034	1,551	1,513	1,123	0,366	0,511	
\log_2 poměru exprese			0,018	0,016	0,900	0,421	0,121	0,610	0,130	0,127	
\log_2 poměru exprese			-0,86	-0,75	0,048	0,63	0,60	0,168	-1,45	-0,97	
GDM-D vs KONTROLY											
Poměr exprese			**			UP	UP	DOWN	DOWN	**	
$P=$			1,682	0,874	1,228	3,957	4,618	0,536	0,182	0,390	
\log_2 poměru exprese			0,076	0,583	0,553	0,048	0,002	0,047	0,047	0,088	
\log_2 poměru exprese			0,75	-0,19	0,297	1,98	2,21	-0,899	-2,46	-1,36	
GDM-D vs GDM-I											
Poměr exprese			UP								
$P=$			3,056	1,471	1,188	2,552	3,051	0,477	0,497	0,764	
\log_2 poměru exprese			0,001	0,207	0,459	0,232	0,142	0,156	0,409	0,746	
\log_2 poměru exprese			1,61	0,56	0,249	1,35	1,61	-1,067	-1,01	-0,39	

Expres hormon senzitivní lipázy (LIPE) byla ve všech vyšetřovaných tkáních u žen s GDM spíše snížena, nejvýraznější a také statisticky významný pokles exprese byl zaznamenán v souboru GDM-D v s.c. tukové tkáni ($5,5x$, $P=0,047$) (Obr. 33, Tab. 22).

4.3.5 Expres LDL receptoru, estrogenních receptorů 1, 2 a fruktóza-1,6-bisfosfatázy 1

Vzhledem k výrazné elevaci estrogenních hormonů v maternálním organizmu na konci těhotenství byla také sledována senzitivita vyšetřovaných tkání (v podobě přítomnosti obou podtypů estrogenních receptorů) na tuto stimulaci. Bylo zjištěno, že nejvyšší exprese mRNA pro ESR1 i ESR2 je přítomna v s.c. tukové tkáni, nejnižší v placentě (Obr. 34 A, B), přičemž exprese ESR2 (estrogenního receptoru β) byla ve všech vyšetřovaných tkáních vyšší než ESR1 (α), a tento rozdíl v expresi obou receptorů byl největší v subkutánní tukové tkáni – zejm. u žen s GDM kompenzovaným dietou (Obr. 34 C).

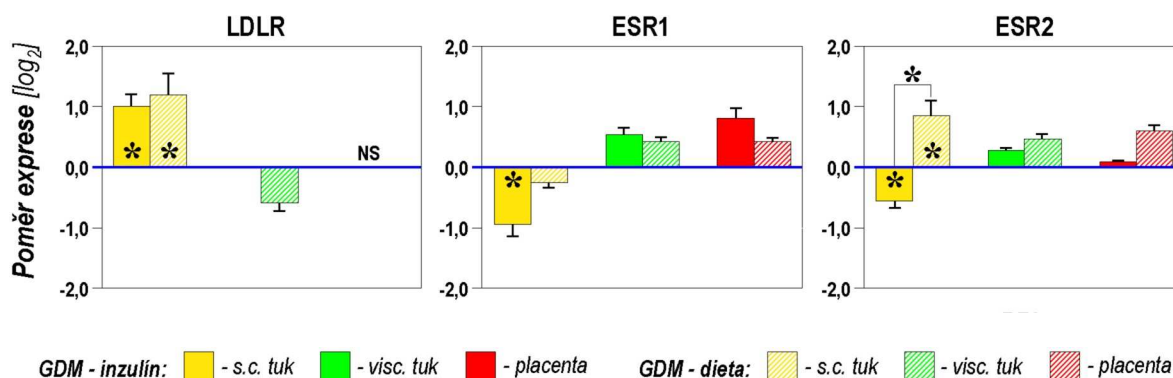
Obrázek 34. Poměr průměrné exprese sledovaných genů vůči B2M v jednotlivých skupinách a v různých typech vyšetřovaných tkání. **A** ESR1; **B** ESR2; **C** poměr exprese ESR2/1; **D** LDLR; **E** fruktóza-1,6-bisfosfatáza (FBP1). Osa y je v log měřítku (kromě C). Expres B2M = 1. NS = nebylo stanoveno.



V subkutánní tukové tkáni byla exprese ESR1 i ESR2 ve skupině GDM-I proti kontrolám signifikantně snížena ($1,93x$, $P=0,045$; resp. $1,48x$, $P=0,033$) (Obr. 35, Tab. 23). Ve skupině

GDM-D byla naopak exprese ESR2 v s.c. tuku signifikantně zvýšena proti kontrolám (1,79x, $P=0,016$) i proti skupině s GDM-I (2,65x, $P=0,001$) (Obr. 35, Tab. 23). U ESR1 nebyly v ostatních tkáních ani skupinách zaznamenány další statisticky významné změny exprese.

Obrázek 35. *Dynamika změn exprese genů pro LDL receptor a estrogenní receptory 1 a 2. Expresse sledovaného genu v kontrolní skupině pro každou vyšetřovanou tkáň = 1, tj. v grafu ~ 0 (znázorněno modře), geny up-regulované jsou na ose y vyneseny v kladných hodnotách, geny down-regulované jsou v hodnotách záporných. * $P < 0,05$.*



Expresse LDLR byla vyšší v subkutánní než ve visc. tukové tkáni (Obr. 34 D). V s.c. tuku bylo současně zaznamenáno signifikantní zvýšení exprese LDLR jak u GDM-I, tak u GDM-D (2x, $P=0,008$; resp. 2,28x, $P=0,003$) (Obr. 35, Tab. 23).

Expresse FBP1 byla potvrzena ve všech vyšetřovaných tkáních, nejnižší v placentě (Obr. 34E), ale nebyl nalezen žádný rozdíl v její expresi mezi kontrolami a těhotnými s GDM.

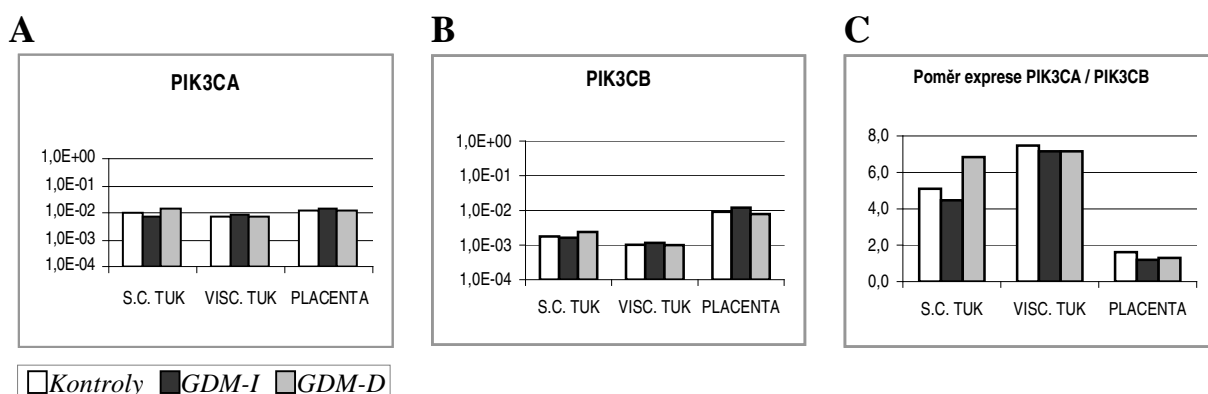
Tabulka 23. *Hodnoty míry exprese genů pro LDL receptor a estrogenní receptory 1 a 2 ve vyšetřovaných tkáních u těhotných s GDM kompenzovaným inzulinem (GDM-I) a nebo dietou (GDM-D) proti kontrolní skupině těhotných a mezi sebou navzájem. Statistická významnost sledované změny je vyjádřena hodnotou P. Míra exprese genu v kontrolní skupině je 1.*

Gen	Skupina	Tkáň	LDLR		ESR1			ESR2			
			s.c. tuk	visc. tuk	s.c. tuk	visc. tuk	placenta	s.c. tuk	visc. tuk	placenta	
GDM-I vs KONTROLY			UP			DOWN			DOWN		
Poměr exprese			2,005	1,001	0,518	1,457	1,746	0,677	1,205	1,065	
P=			0,008	0,999	0,045	0,102	0,109	0,033	0,415	0,800	
\log_2 poměru exprese			1,00	0,00	-0,95	0,54	0,804	-0,56	0,27	0,091	
GDM-D vs KONTROLY			UP						UP		
Poměr exprese			2,279	0,660	0,837	1,329	1,336	1,793	1,371	1,515	
P=			0,003	0,115	0,768	0,255	0,369	0,016	0,326	0,294	
\log_2 poměru exprese			1,19	-0,60	-0,26	0,41	0,418	0,84	0,46	0,599	
GDM-D vs GDM-I									UP		
Poměr exprese			1,137	0,659	1,616	0,912	0,765	2,649	1,137	1,422	
P=			0,760	0,239	0,078	0,851	0,698	0,001	0,688	0,425	
\log_2 poměru exprese			0,18	-0,60	0,69	-0,13	-0,386	1,41	0,19	0,508	

4.3.6 Genová exprese katalytických podjednotek α a β fosfatidylinositol-3-kinázy

Metodou qPCR byla potvrzena relativně výrazná exprese obou řetězců – α (PIK3CA) i β (PIK3CB) katalytické podjednotky PI3K ve všech vyšetřovaných tkáních (Obr. 36 A, B). V subkutánní i viscerální tukové tkáni se PIK3CB exprimuje přibližně 5 – 10x méně, než PIK3CA; v placentě je poměr jejich mRNA přibližně stejný (Obr. 36 C). Při kvantifikaci genové exprese obou těchto podjednotek metodou qPCR však nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v genové expresi mezi zdravými kontrolami a ženami s GDM.

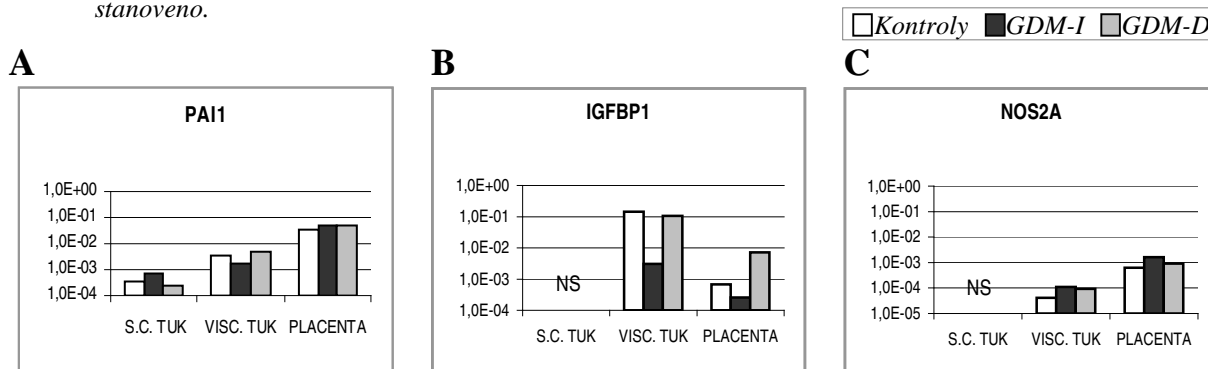
Obrázek 36. Poměr průměrné exprese PIK3CA, PIK3CB vůči B2M v jednotlivých skupinách a v různých typech vyšetřovaných tkání a poměr jejich vzájemné exprese. Osa y je v log měřítku. Expresse B2M = 1.



4.3.7 Expresse inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1, insulin-like growth faktoru vazebného proteinu 1 a inducibilní NO syntázy

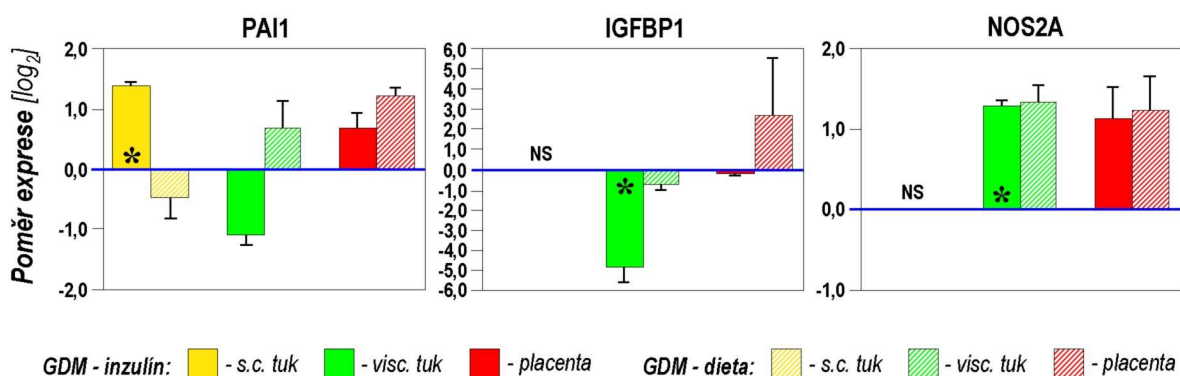
PAI1, který také bývá řazen mezi adipokiny, je produkován ve všech námi vyšetřovaných tkáních, ovšem přibližně s rozdíly exprese na úrovni jednoho řádu je nejvíce exprimován placentou, méně viscerální a nejméně subkutánní tukovou tkání (Obr. 37 A).

Obrázek 37. Poměr průměrné exprese PAI1, IGFBP1 a inducibilní NO syntázy 2A vůči B2M v jednotlivých skupinách a v různých typech vyšetřovaných tkání. Osa y je v log měřítku. Expresse B2M = 1. NS = nebylo stanoveno.



Změny exprese PAI1 v závislosti na existenci GDM jsou nejvíce patrné právě v s.c. tuku, ve kterém je nejméně exprimován – ve skupině žen s GDM-I byla zjištěna jeho signifikantní upregulace proti kontrolám (2,58x, $P=0,016$) (Obr. 38, Tab. 24). Ostatní změny jeho exprese nebyly statisticky významné, u skupiny GDM-D byl proti kontrolám pozorován trend ke zvýšení exprese 2,34x ($P=0,060$).

Obrázek 38. *Dynamika změn exprese genů pro PAI1, IGFBP1 a NOS2A (inducibilní). Expresse sledovaného genu v kontrolní skupině pro každou vyšetřovanou tkáň = 1, tj. v grafu ~ 0 (znázorněno modře), geny up-regulované jsou na ose y vyneseny v kladných hodnotách, geny down-regulované jsou v hodnotách záporných. * $P<0,05$. NS = nebylo stanoveno.*



IGFBP1, popsáný také jako placentární protein 12, byl exprimován jak v placentě, tak i ve viscerální tukové tkáni, kde ovšem byla jeho exprese o 1-2 řády vyšší než exprese placentou (Obr. 37 B). Ve visc. tuku bylo také zjištěno výrazné statisticky významné snížení exprese IGFBP1 29,41x ($P=0,006$) u žen s GDM kompenzovaným inzulinem proti zdravým těhotným (Obr. 38, Tab. 24). Ostatní změny exprese IGFBP1 nebyly statisticky významné.

Tabulka 24. *Hodnoty poměru exprese genů pro PAI1, IGFBP1 a NOS2A (inducibilní) ve vyšetřovaných tkáních u těhotných s GDM kompenzovaným inzulinem (GDM-I) a nebo dietou (GDM-D) proti kontrolní skupině těhotných a mezi sebou navzájem. Statistická významnost sledované změny je vyjádřena hodnotou P. Expresse genu v kontrolní skupině je 1.*

Gen	Skupina	Tkáň	PAI1			IGFBP1		NOS2A	
			s.c. tuk	visc. tuk	placenta	visc. tuk	placenta	visc. tuk	placenta
GDM-I vs KONTROLY									
			UP			DOWN		UP	
			2,575	0,467	1,613	0,034	0,864	2,440	2,197
			P=0,016	0,186	0,162	0,006	0,828	0,028	0,129
			log₂ poměru exprese	1,36	-1,10	0,690	-4,89	-0,212	1,29
GDM-D vs KONTROLY									
									**
			0,712	1,602	2,341	0,584	6,555	2,543	2,349
			P=0,501	0,565	0,060	0,667	0,183	0,057	0,160
			log₂ poměru exprese	-0,49	0,68	1,227	-0,78	2,713	1,35
GDM-D vs GDM-I									
			DOWN	**		UP			
			0,276	3,427	1,451	17,324	7,590	1,042	1,069
			P=0,005	0,091	0,380	0,040	0,214	0,920	0,906
			log₂ poměru exprese	-1,86	1,78	0,537	4,11	2,924	0,06

Genová exprese inducibilní NO syntázy 2A byla vyšší v placentě než ve visc. tukové tkáni (Obr. 37). V obou vyšetřovaných tkáních byla exprese NOS2A vyšší u těhotných s GDM (Obr. 38, Tab. 24) proti kontrolní skupině. Výraznější a také statisticky signifikantní byly změny exprese ve visc. tuku – u GDM-I byla upregulace 2,44x ($P=0,028$) a u GDM-D 2,54x ($P=0,057$).

4.4 Stanovení sérových koncentrací základních adipokinů z fetální a maternální krve u těhotných (s / bez gestačního diabetu mellitu) a dalších biochemických parametrů z maternální krve

V maternální i fetální krvi byly měřeny sérové koncentrace tří základních adipokinů - adiponektinu, leptinu a resistinu. Mimo to byly v periferní žilní krvi rodiček hodnoceny další biochemické parametry, které se užívají při hodnocení stavu inzulínové senzitivity organismu.

4.4.1 Sérové koncentrace – rozdíly mezi sledovanými skupinami

V souboru maternálních sér byly stanoveny sérové koncentrace biochemických markerů, které se uplatňují při hodnocení stavu inzulínové rezistence a hodnocení kompenzace GDM (glukóza, inzulín, C-peptid, glykovaný hemoglobin, TAG) a z nich spočítány indexy hodnotící míru přítomné inzulínové rezistence (HOMA index, QUICKI a Mc'Auleyho index, poměr C-peptid / glukóza) a dále sérové koncentrace PRL, E2, IGF1 a IGFBP1 (Tab. 25).

V celém souboru vzorků maternální a fetální krve byly hodnoceny sérové koncentrace základních adipokinů – ADIPOQ, LEP a RETN (Tab. 25).

V maternální krvi byly mezi jednotlivými skupinami nalezeny statisticky významné rozdíly v sérových koncentracích leptinu ($P=0,041$), resistinu ($P=0,001$), glukózy ($P=0,027$) a glykovaného hemoglobinu ($P=0,002$). U všech čtyřech jmenovaných parametrů byly nejvyšší sérové koncentrace ve skupině těhotných s GDM kompenzovaným inzulínem (Tab. 25).

U sérových koncentrací ADIPOQ po normalizaci podle BMI byly zjištěny rozdíly v sérových koncentracích – kdy nejvyšší ADIPOQ/BMI byl u zdravých těhotných a nejnižší ve skupině žen s GDM-I (Tab. 25). Tato změna ovšem nebyla statisticky významná a dala by se nazvat spíše trendem ($P=0,093$).

Sérové koncentrace inzulínu byly odlišné u žen s GDM-I, ale tyto hodnoty jsou zkráceny externě dodávaným humánním inzulínem, a proto nebyly pro statistické hodnocení, ani pro následné výpočty inzulínovou senzitivitu hodnotících indexů použity.

Ve fetální krvi byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi sérovými koncentracemi leptinu ($P=0,028$), kdy nejvyšší koncentrace LEP byly u dětí matek s GDM-I (Tab. 25).

Sérové koncentrace fetálního ADIPOQ (Tab. 25) byly signifikantně vyšší než koncentrace maternální ($P<0,000001$), fetální koncentrace LEP byly proti maternálním signifikantně nižší ($P=0,005$), zatímco mezi koncentracemi maternálního a fetálního RETN nebyly zjištěny žádné rozdíly ($P=0,801$).

Tabulka 25. Sérové koncentrace vybraných biochemických parametrů ve vyšetřovaných skupinách těhotných žen průměrná hodnota \pm SE a zhodnocení statistické významnosti rozdílů mezi těmito skupinami (P ; statisticky významné změny jsou při $P<0,05$). Ženy s těhotenským diabetem kompenzovaným inzulínem (GDM-I) nebo dietou (GDM-D). *Sérové koncentrace inzulínu u těhotných léčených externě aplikovaným inzulínem jsou zkrácené, a nemohly být proto využity do dalšího hodnocení. NS = nebylo stanoveno. **Do statistického hodnocení byla zahrnuta pouze skupina kontrol a GDM-D. *** Pro výpočet tohoto poměru byly použity koncentrace C-peptidu v $\mu\text{g/l}$, jak je obvyklé ($1 \mu\text{g/l} = 0,34 \text{ nmol/l}$).

	Kontroly	GDM-I	GDM-D	P
MATERNÁLNÍ	N = 13	N = 9	N = 5	
Adiponectin [mg.l^{-1}]	24,45 \pm 2,33	20,11 \pm 3,04	23,62 \pm 3,93	0,514
Adiponectin/BMI	0,98 \pm 0,10	0,63 \pm 0,10	0,88 \pm 0,19	0,093
Leptin [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	21,79 \pm 2,72	39,58 \pm 8,11	18,90 \pm 7,18	0,041
Resistin [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	10,92 \pm 0,58	12,63 \pm 1,33	6,22 \pm 0,5	0,001
Glukóza [mmol.l^{-1}]	3,92 \pm 0,12	4,76 \pm 0,28	4,32 \pm 0,13	0,027
Inzulín [mIU.l^{-1}] **	23,38 \pm 1,96	144,82 \pm 64,56 *	17,76 \pm 3,82	0,172
C-peptid [nmol.l^{-1}]	0,61 \pm 0,05	0,99 \pm 0,29	0,66 \pm 0,12	0,886
Glykovaný hemoglobin [%]	3,39 \pm 0,10	4,12 \pm 0,21	3,14 \pm 0,3	0,002
IGF1 [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	434,77 \pm 39,07	462,11 \pm 61,21	443,20 \pm 75,72	0,943
IGFBP1 [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	122,52 \pm 13,20	98,33 \pm 19,74	104,74 \pm 9,40	0,502
Triacylglyceroly [mmol.l^{-1}]	3,93 \pm 0,47	3,47 \pm 0,26	4,78 \pm 1,32	0,808
Prolaktin [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	303,23 \pm 38,76	366,31 \pm 116,4	234,20 \pm 49,55	0,777
Estradiol [nmol.l^{-1}]	83,36 \pm 8,82	74,06 \pm 11,93	79,30 \pm 20,25	0,938
HOMA index **	4,04 \pm 0,34	NS	3,44 \pm 0,77	0,405
QUICKI **	0,31 \pm 0,00	NS	0,32 \pm 0,01	0,239
McAuleyho index **	3,92 \pm 0,15	NS	4,17 \pm 0,47	0,497
Poměr C-peptid/glukóza ***	0,46 \pm 0,02	0,51 \pm 0,13	0,45 \pm 0,03	0,844
FETÁLNÍ	N = 13	N = 9	N = 5	P
Adiponectin [mg.l^{-1}]	76,08 \pm 12,99	64,90 \pm 12,08	109,68 \pm 11,86	0,141
Leptin [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	8,10 \pm 1,76	24,29 \pm 6,44	8,44 \pm 2,95	0,028
Resistin [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	11,02 \pm 1,46	10,93 \pm 0,88	10,42 \pm 0,82	0,958

4.4.2 Vzájemné korelace klinických a biochemických parametrů

Hodnocení vzájemných vztahů mezi jednotlivými stanovenými parametry (klinickými i biochemickými) napříč celým vyšetřovaným souborem (resp. odděleně maternální a fetální data) bylo provedeno pomocí Spearmanovy korelační analýzy.

U těhotných byla zjištěna pozitivní korelace mezi BMI stanoveným 3. den po porodu (BMI p.p.) a % tělesného tuku ($R=0,822$) a BMI před těhotenstvím ($R=0,965$; obě $P<0,0001$).

Ze stanovených sérových a klinických parametrů korelovaly sérové koncentrace LEP pozitivně s BMI p.p. ($R=0,675$, $P<0,0001$), % tělesného tuku ($R=0,559$, $P=0,00255$), glykovaným hemoglobinem ($R=0,577$, $P=0,00169$) a glykemií ($R=0,464$, $P=0,0151$).

U sérových koncentrací maternálního RETN byla pozorována pozitivní korelace se koncentracemi prolaktinu ($R=0,418$, $P=0,03$).

Hodnoty glykémie pozitivně korelovaly s množstvím glykovaného hemoglobinu ($R=0,564$, $P=0,00229$).

Sérové koncentrace inzulínu (hodnoceno pouze u kontrol a GDM-D) pozitivně korelovaly s HOMA indexem ($R=0,651$, $P=0,00333$) a negativně s QUICKI ($R=-0,651$, $P=0,00333$) a Mc'Auleyho indexem ($R=-0,593$, $P=0,00938$). Stejné závislosti byly pozorovány mezi uvedenými indexy a sérovými koncentracemi C-peptidu ($R=0,93$, $P<0,0001$; $R=-0,93$, $P<0,0001$ a $R=-0,637$, $P=0,00442$).

Sérové koncentrace TAG korelovaly pozitivně s koncentracemi E2 ($R=0,533$, $P=0,00438$) a negativně s Mc'Auleyho indexem ($R=-0,804$, $P<0,0001$). S tímto indexem korelovala negativně také prolaktinémie ($R=-0,598$, $P=0,00878$).

Vzájemná závislost mezi dalšími vyšetřovanými parametry nebyla pozorována.

4.4.3 Porovnání sérových koncentrací vybraných parametrů u těhotných proti stavu mimo těhotenství

Do této analýzy byla zařazena glykémie a sérové koncentrace dalších parametrů (adiponectin, inzulín, triacylglyceroly, prolaktin a estradiol), které se nelišily mezi jednotlivými skupinami těhotných, a tvořily proto jeden soubor. Byly porovnávány se sérovými koncentracemi stanovenými mimo těhotenství (měřeno v rámci hodnocení změn adiponectinu během menstruačního cyklu) (Tab. 26).

Pro hodnocení sérových koncentrací ADIPOQ byly použity průměrné měsíční koncentrace ADIPOQ stanovené v rámci menstruačního cyklu, které byly signifikantně vyšší ($P=0,016743$) než hodnoty stanovené u těhotných.

Do souboru těhotných byly u parametru INS zařazeny pouze zdravé těhotné a těhotné s GDM kompenzovaným dietou.

Tabulka 26. Sérové koncentrace vybraných biochemických parametrů u zdravých netěhotných a těhotných žen průměrná hodnota \pm SE a zhodnocení statistické významnosti rozdílů mezi těmito skupinami (P ; statisticky významné změny jsou při $P<0,05$. *Sérové koncentrace INS u těhotných léčených externě aplikovaným inzulínem jsou zkreslené, a nebyly proto využity do tohoto hodnocení.. **Jako hodnoty E2 u netěhotných žen byly použity maximální sérové konc. E2 stanovené během menstruačního cyklu.

	Zdravé netěhotné	Těhotné	P
Adiponectin [mg.l ⁻¹]	35,68 \pm 8,15	22,85 \pm 1,66	0,01674
Glukóza [mmol.l ⁻¹]	4,62 \pm 0,11	4,51 \pm 0,30	0,86694
Inzulín [mIU.l ⁻¹]*	4,97 \pm 1,15	21,82 \pm 1,81	0,00003
Triacylglyceroly [mmol.l ⁻¹]	0,87 \pm 0,05	3,93 \pm 0,34	0,00018
Prolaktin [μ g.l ⁻¹]	14,38 \pm 1,97	311,47 \pm 43,32	0,00322
Estradiol [nmol.l ⁻¹]**	1,14 \pm 0,24	79,51 \pm 6,65	<0,00001

V těhotenství byly statisticky významně zvýšené sérové koncentrace INS ($P=0,00003$), TAG ($P=0,000181$), PRL ($P=0,003222$) a E2 ($P<0,00001$) proti stavu mimo těhotenství.

Glykémie se u těhotných proti netěhotným mladým zdravým kontrolám nelišily ($P=0,866936$).

4.4.4 Vzájemný vztah změn genové exprese a sérových koncentrací

U některých hodnocených klinických a biochemických parametrů byly nalezeny také korelace jejich hodnot s mírou exprese genů vyšetřovaných pomocí qPCR.

Expres ADIPOQ a ADIPOR2 v s.c. tukové tkáni korelují negativně s % tělesného tuku ($R=-0,403$, $P=0,0407$; resp. $R=-0,441$, $P=0,0241$) a se sérovými koncentracemi maternálního resistinu ($R=-0,436$, $P=0,0261$; resp. $R=-0,41$, $P=0,0371$) a pozitivně korelují s maternální adiponectinemií normalizovanou podle BMI ($R=0,458$, $P=0,0187$; resp. $R=0,413$, $P=0,0361$).

Expres ADIPOR1 v s.c. tuku korelovala negativně se sérovými koncentracemi C-peptidu i inzulínu ($R=-0,473$, $P=0,0149$; resp. $R=-0,411$, $P=0,0371$).

Pro expresi ADIPOQ ve visc. tukové tkáni nebyla nalezena závislost na žádném ze sledovaných parametrů, stejně jako pro expresi RETN ve všech tkáních a LEP v s.c. tuku.

Genová exprese LEP v tuku viscerálním pozitivně korelovala s lačnou glykemií ($R=0,516$, $P=0,0119$) a u LEP exprimovaného visc. tukem i placentou byla pozorována tendence k pozitivní korelaci s maternální leptinemií ($R=0,364$, $P=0,0868$; resp. $R=0,348$, $P=0,0936$).

Expresí IGFBP1 viscerální tukovou tkání korelovala negativně s BMI p.p. ($R=-0,456$, $P=0,0285$), sérovými koncentracemi maternálního resistinu ($R=-0,451$, $P=0,0305$) a glykemií ($R=-0,425$, $P=0,0429$) a pozitivně se sérovými koncentracemi ADIPOQ normalizovanými podle BMI ($R=0,485$, $P=0,019$). Statisticky významný vztah mezi genovou expresí IGFBP1 ve visc. tuku nebo placeně a jeho sérovou koncentrací nebyl nalezen.

Také nebyl nalezen vzájemný vztah mezi prolaktinemií a expresí PRL visc. tukovou tkání, ale tato exprese korelovala negativně se sérovými koncentracemi maternálního resistinu ($R=-0,591$, $P=0,00308$), glykemií ($R=-0,439$, $P=0,036$) a % glykovaného hemoglobinu ($R=-0,45$, $P=0,0309$).

Genová exprese IRS2 korelovala v s.c. i ve visc. tuku negativně s BMI p.p. ($R=-0,388$, $P=0,0494$; resp. $R=-0,448$, $P=0,0321$), sérovými koncentracemi resistinu ($R=-0,537$, $P=0,00491$; resp. $R=-0,447$, $P=0,0325$) a inzulinemií ($R=-0,584$, $P=0,00183$; resp. $R=-0,511$, $P=0,0129$). IRS2 ve visc. tuku navíc koreloval negativně také s koncentracemi C-peptidu ($R=-0,416$, $P=0,0479$).

Expresí GLUT4 v s.c. tukové tkáni negativně korelovala s BMI p.p. ($R=-0,476$, $P=0,0141$) a s % tělesného tuku ($R=-0,501$, $P=0,00938$). S tím také negativně korelovala míra exprese GLUT4 v tuku viscerálním ($R=-0,417$, $P=0,0473$).

Byla také nalezena pozitivní korelace exprese IL-6 a IL-8 v subkutánním tuku s BMI p.p. ($R=-0,436$, $P=0,0261$; resp. $R=0,414$, $P=0,0354$) a negativní korelace s maternálními koncentracemi ADIPOQ normalizovanými podle BMI ($R=-0,533$, $P=0,00524$; resp. $R=-0,45$, $P=0,0214$).

5 DISKUZE

5.1 Charakterizace změn sérových koncentrací adiponectinu v závislosti na menstruačním cyklu

Nejdůležitějším nálezem této části práce je zjištění, že změny sérových koncentrací celkového adiponectinu nejeví závislost na hormonálních změnách charakteristických pro průběh menstruačního cyklu. Přesto analýza individuálních změn sérových koncentrací celkového adiponectinu prokázala jejich relativně velké kolísání během menstruačního cyklu, závislost na současně probíhajících změnách sérových koncentrací sledovaných pohlavích hormonů (LH, FSH, PRG, E2) však nebyla prokázána.

Tato práce jako první hodnotila možný vliv menstruačního cyklu na sérové koncentrace adiponectinu po více než deseti letech, kdy je adiponectin studován, přestože například u dalšího adipokinu – leptinu – byla závislost jeho sérových koncentrací na menstruačním cyklu popsána – se zvýšením koncentrací leptinu ve fázi luteální proti fázi folikulární [85]. U adiponectinu je také stejně jako u leptinu popsána závislost jejich sérových koncentrací na pohlaví, kdy u žen jsou vyšší než u mužů [174]. Naše výsledky naznačují, že regulace sérových koncentrací adiponectinu během menstruačního bude pravděpodobně odlišná od regulace koncentrací leptinu. Neprokázaná závislost změn sérových koncentrací adiponectinu v průběhu menstruačního cyklu je do určité míry překvapivá, protože *in vitro* i v experimentálních studiích byl popsán signifikantní vliv androgenů i estrogenů na koncentrace adiponectinu [87, 88].

Možným vysvětlením pro získání negativních výsledků v této části práce je, že byly měřeny pouze sérové koncentrace celkového adiponectinu a ne dynamika změn jeho jednotlivých frakcí, tedy LMW, MMW a HMW oligomerů (viz Oddíl 1.3.1.1 *Struktura a uspořádání adiponectinu*), jejichž poměr může ovlivňovat biologickou dostupnost a účinnost ADIPOQ i beze změn sérových koncentrací celkového adiponectinu [68]. Vyšetření dynamiky změn poměrů jednotlivých izoform adiponectinu je jistě výzvou do budoucnosti, ale bohužel všechny dosud komerčně dostupné kity pro měření sérových koncentrací ADIPOQ umožňují stanovení pouze celkového adiponectinu a ne jeho jednotlivých frakcí.

5.2 Změny produktů tukové tkáně a placenty v těhotenství komplikovaném gestačním diabetem mellitem

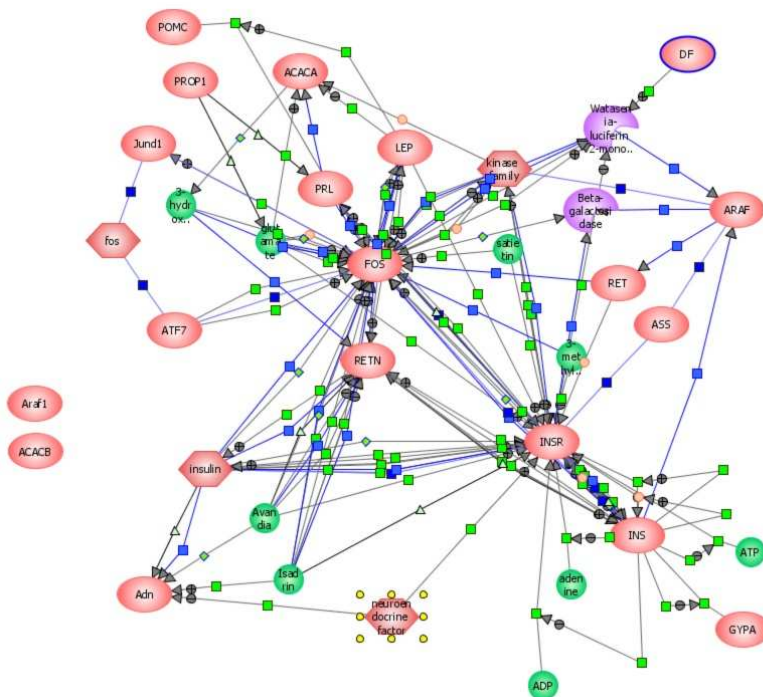
Změny genové exprese byly hodnoceny dvěma metodami – pomocí expresních arrays fokusovaných na signální dráhu inzulínového receptoru provedených na vybraném podsouboru a/nebo pomocí qPCR provedené na celém souboru těhotných žen.

5.2.1 Kvantifikace genové exprese: qPCR vs array

Přesto, že otázkám spojeným s výzkumem patogenetických okolností vzniku diabetu mellitu je věnována velká pozornost (viz např. www.diabetesgenome.org; <http://t1dbase.org>) prací specificky zaměřených na GDM je značně menší počet.

Pro kvantifikaci změn genové exprese byly v první fázi naší práce použity expresní arrays firmy SuperArray. Výhodou těchto cílených arrayí je vedle cenové dostupnosti i zaměření na určité, signálně definované regulační cesty, případně onemocnění. Z tohoto důvodu je pravděpodobné, že geny se změněnou expresí jsou v přímém vztahu k analyzovanému problému (v případě námi vybraných arrayí k inzulínové signalizaci), což zjednodušuje vyhodnocení komplikovaných vztahů mezi jednotlivými geny (Obr. 39). Na druhou stranu, předem definovaný výběr znemožňuje nezávislou analýzu genů transkriptomu, jako je tomu u vysoce denzních arrays.

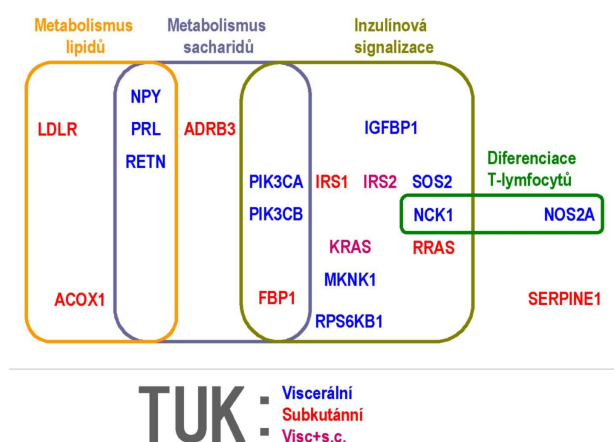
Obr. 39. Pro modelaci vzájemných vztahů mezi vyšetřovanými geny lze využít databázových programů zohledňujících jejich funkční vazby. Na obrázku z programu PathwayArchitect (Stratagene) jsou znázorněny vzájemné vztahy mezi geny rozdílně exprimovanými ve viscerální tukové tkáni a placentě.



Na základě výsledků arrayů bylo v kontrolách v porovnání s ženami s GDM identifikováno 14 genů s rozdílnou expresí ve viscerální tkáni, 8 v subkutánní a 13 v placentě. Celkem jsme charakterizovali 26 genů s rozdílnou expresí alespoň v jedné tkáni: ACOX1, ADRB3, ANG, DOK3, EIF4E, FBP1, IGFBP1, INSL3, IRS1, IRS2, KRAS, LDLR, MKNK1, NCK1, NOS2A, NPY, PIK3CA, PIK3CB, PKLR, PRL, RETN, RPS6KA1, RPS6KB1, RRAS, SERPINE1, SOS2.

Tyto geny bylo možné rozdělit do třech skupin: regulace metabolismu lipidů a sacharidů a regulace inzulínové signalizace; zbylé geny tvoří ojedinělé zástupce dalších regulačních a metabolických drah (Obr. 40).

Obr 40. Diagram genů se významně změnou expresí z arrayů v tukových tkáních
Geny jsou seřazeny s ohledem na význam v zapojení do jednotlivých signálních nebo metabolických drah. Schematicky je dodržen směr signální aktivace (shora dolů).

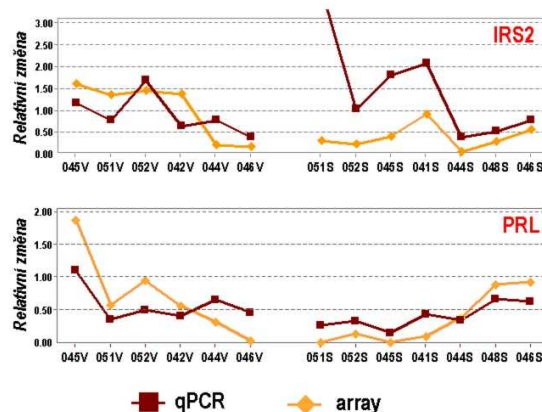


Díky zaměření arraye jsme nezaznamenali změny charakterizované Vohlovou et al. popisující nejvyšší rozdíly mezi s.c. a viscerální tukovou tkání u obézních mužů na úrovni genů zapojených ve Wnt signalizaci a diferenciaci adipocytů (CEBPA a HOX) [175].

Z výsledků cílených arrayů vyplývá, že alterace inzulínové signalizace se v případě námi vyšetřovaných žen s GDM týká obou hlavních signálně-transdukčních cest INS, tedy přenosu signálu cestou Ras-Raf i cestou aktivovaných IRS (Obr. 3, str. 10). Více signifikantních změn v tukové tkáni bylo nalezeno ve viscerálním tuku, než v subkutánním. Změny v subkutánní tukové tkáni měly spíše charakter rozdílné exprese v proteinech zapojených v transportu a metabolizaci sacharidů a lipidů, čemuž odpovídá i rozdíl v expresi GLUT4, zaznamenaný pomocí qPCR (Obr. 28). Naopak, změny ve viscerálním tuku se týkaly především regulátorů inzulínové signalizace. Předpoklad, že viscerální tuková tkáň má dominantní regulační úlohu, zatímco subkutánní tuková tkáň je metabolickou exekutivní

složkou adipocytárního poolu bude nezbytné prověřit v dalších experimentech. Zatím není rovněž zcela jasné, zda změny, které byly zaznamenány jsou příčinou vzniku GDM, nebo vznikají v jeho důsledku.

Obr 41. Komparace výsledků stanovení genové exprese pomocí arrayí a qPCR ve vzorcích subkutánní a viscerální tukové tkáně. Pro účely srovnání byly hodnoty výsledků stanovení obou metod normalizovány do přibližně stejného měřítka.



Po provedení arrays jsme přistoupili k přesnějšímu vyšetření genové exprese vybraných genů pomocí qPCR, které umožnilo získat přesnější výsledky v širší kohortě vyšetřovaných vzorků. Tento postup nám rovněž umožnil provést komparaci mezi výsledky získanými pomocí arrays a qPCR. Z přímého srovnání obou metod (Obr. 41) vyplývá, že v hodnocení dynamiky změn exprese jsou obě metody srovnatelné v rozmezí, které je detekovatelné pomocí arrays (dynamický rozsah 10^3 , maximální senzitivita 10 fM; <http://www.superarray.com/>). Pro geny velmi silně exprimované, nebo naopak velmi slabě exprimované je výrazně přesnější použití qPCR umožňující větší flexibilitu v dávkování vzorku mRNA (RNA) a vyznačující se řádově vyšším dynamickým rozsahem (v našem případě 10^7).

Změny zaznamenané pomocí expresních arrays v našem experimentu je rovněž hodnotit s jistou mírou opatrnosti vzhledem k malému počtu vyšetřovaných vzorků. Ačkoliv u většiny genů se změny exprese ve smyslu up- nebo downregulace zjištěné pomocí arrays potvrdily i při vyšetření metodou qPCR na celém souboru, v případě hodnocení genové exprese α i β řetězce katalytické podjednotky PI3K (PIK3CA a PIK3CB) nebyla downregulace u žen s GDM stanovená pomocí arrays metodou qPCR potvrzena.

5.2.2 Hodnocení změn adipokinů a jejich regulátorů

Adiponectin (ADIPOQ) je adipokin s inzulín-senzitizujícími účinky, který byl Schafflerem et al. popsán jako exkluzivní produkt adipocytů [59].

K velmi zajímavým zjištěním patří zjištění, že i přes potvrzení řádově 1000x vyšších sérových koncentrací adiponectinu proti koncentracím leptinu v maternální krvi, toto není reflektováno ve výši genové exprese - exprese leptinu proti ADIPOQ je ve všech vyšetřovaných tkáních vyšší. Toto je možné vysvětlit delším biologickým poločasem adiponectinu oproti leptinu, i když přesná data známa nejsou, nebo hypotézou existence dalšího zdroje ADIPOQ mimo tukovou tkáň, která by ovšem popírala dosud téměř bez výjimek [35,36] uznávanou exkluzivitu tukové tkáně jako jediného zdroje adiponectinu.

V posledních dvou letech byly publikovány rozporuplné práce dokazující [35,36] či naopak vyvracející [176] expresi ADIPOQ také buňkami syncytiotrofoblastu. Z našich výsledků vyplývá, že pokud se mRNA pro ADIPOQ v placentární tkáni vyskytuje, jsou přítomny různé posttranskripčně modifikované (alternativně sestřižené?) varianty (Obr. 23), jejichž typ nesouvisí s GDM / obezitou / fyziologickým těhotenstvím. Celkové množství těchto transkriptů je řádově ($10^{-3} - 10^{-4}x$) nižší, než je množství ADIPOQ mRNA přítomné v s.c., resp. visc. tukové tkáni (Obr. 24 A). Existence transkripčních variant ADIPOQ nebyla dosud popsána a jejich existence (resp. přítomnost alterovaných proteinových produktů ADIPOQ) v placentě by mohla být vysvětlením rozporných výsledků. Pro potvrzení této hypotézy bude nutné charakterizovat sekvenci amplikonů vznikajících RT-PCR z placentární mRNA.

Ačkoliv se genová exprese ADIPOQ v subkutánní i viscerální tukové tkáni statisticky významně nelišila u těhotných s GDM-I, resp. GDM-D proti zdravým kontrolám, byl ve vyšetřovaném souboru u těhotných s GDM-I zaznamenán trend ke snížení exprese ADIPOQ proti kontrolám ($P=0,072$) a signifikantní pokles genové exprese proti skupině s GDM-D ($P=0,005$; Obr. 25, Tab. 18). Vzhledem k tomu, že mezi oběma podskupinami těhotných s GDM, tedy GDM-I a GDM-D, nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v % tělesného tuku ($39,61 \pm 2,35$ vs. $34,12 \pm 3,69$; $P=0,212$) ani v BMI ($32,87 \pm 2,5$ vs. $28,30 \pm 2,31$; $P=0,256$), lze považovat rozdíl v genové expresi ADIPOQ v s.c. tuku za důsledek hlubší poruchy inzulínové signalizace u žen s GDM-I.

Sekrece adiponectinu z 3T3-L1 adipocytů vyžaduje aktivitu PI3K [99]. Smith et al. u pacientů s DM 2. typu popsali v adipocytech snížené množství přes INSR-aktivovaných IRS1 molekul asociovaných do komplexu s PI3K [100], což je považováno za možnou příčinu snížené sekrece adiponectinu z adipocytů a za příčinu poklesu jeho sérových koncentrací u diabetu mellitu 2. typu [3]. Snížení exprese mRNA pro adiponectin i pokles jeho sekrece z 3T3-L1 adipocytů bylo dosaženo přidáním IL-6 nebo TNF α [101], cytokinů, jejichž sérové koncentrace se zvyšují také při existujícím diabetu, ale také po stimulaci buněk inzulínem [102].

V naší práci sice nebyly nalezeny změny exprese *TNF α* ve vztahu k přítomnosti GDM ani obezity referované dříve v literatuře [149, 177], ani jsme pomocí qPCR nepotvrdili snížení exprese obou řetězců katalytické podjednotky PI3K (*PIK3CA* a *PIK3CB*), jejichž downregulace byla stanovena metodou expresních arrays, ovšem na menším souboru, a při pohledu na grafické vyjádření exprese obou genů je zřejmé, že ani v tomto malém souboru nebyla míra exprese v jednotlivých vyšetřovaných podskupinách homogenní (Obr. 20, 21).

V s.c. tuku jsme však u těhotných s GDM-I popsali výrazné (6,32x) a statisticky signifikantní ($P=0,013$) zvýšení exprese prozánětlivého *IL-6* (Obr. 31, Tab. 21). IL-6 je cytokin, který je mimo jiné exprimován také adipocyty. Je popsáno zvýšení jeho sérových koncentrací při rozvoji inzulínové rezistence a při obezitě [12, 178]. Na buněčné linii 3T3-L1 plně diferencovaných adipocytů bylo prokázáno zvýšení exprese mRNA pro IL-6 po stimulaci TNF α , GH, ale i inzulínu, snížení exprese bylo dosaženo přidáním dexametazonu [178].

Současně se zvýšením exprese IL-6 byla v s.c. tuku u těhotných s GDM-I pozorována také výrazná upregulace dalšího prozánětlivého chemokinu, *IL-8* (Obr. 31, Tab. 21). Produkce IL-8 lidskými adipocyty již byla také popsána v literatuře a zvýšení jeho exprese je popsáno po působení IL-1 β a TNF α [179]. Ovlivnění jeho exprese po stimulaci inzulínem, jako je tomu u IL-6 nebylo dosud publikováno.

Zjištěná vyšší exprese IL-6 by mohla být vysvětlením pro downregulaci exprese ADIPOQ v subkutánní tukové tkáni žen s GDM-I.

Vzhledem k uvedeným faktům je otázkou, zda zvýšení exprese IL-6 a IL-8 v s.c. tuku ve skupině GDM-I je důsledkem závažnější inzulínové rezistence, nebo důsledkem zvýšených sérových koncentrací inzulínu při probíhající inzulínoterapii.

Pro možnost posoudit míru infiltrace jednotlivých vzorků imunokompetentními buňkami byla současně ve všech tkáních hodnocena míra pro ně specifického antigenu CD68. Vzhledem k tomu, že exprese CD68 se ve skupině GDM-I v s.c. tuku nelišila od jeho exprese v kontrolní skupině, lze tvrdit, že zvýšení exprese IL-6 i IL-8 u žen s GDM-I v subkutánní tukové tkáni je dáno jeho vyšší produkcí adipocyty.

Expresce CD68 v s.c. tukové tkáni však byla proti kontrolám statisticky významně snížena ve skupině žen s GDM-D, a to 2,1x ($P=0,025$). S ohledem na tuto skutečnost lze do určité míry shovívavěji pohlížet na zvýšení exprese obou interleukinů v s.c. tuku také ve skupině s GDM-D, jejichž exprese sama o sobě byla nesignifikantně také zvýšena proti kontrolnímu souboru, a to u IL-6 3,24x a u IL-8 2,56x (Obr. 31, Tab. 21). Vzhledem k více než dvojnásobně snížené infiltraci tukové tkáně imunokompetentními buňkami, které jsou samy významnými producenty obou interleukinů, lze do jisté míry spekulovat, že i v případě těhotných s GDM kompenzovaných dietou dochází k jednoznačně vyšší produkci IL-6 i IL-8 adipocyty.

V placentě nebyly nalezeny významné rozdíly ani v infiltraci imunokompetentními buňkami ani v expresi vyšetřovaných interleukinů. Z tohoto nálezu lze s určitou obezřetností vyvozovat, že placenta je (pokud vůbec) výrazně menším zdrojem zánětlivých cytokinů účastnících se na rozvoji subklinického zánětu probíhajícího při GDM než subkutánní tuková tkáň.

Nejasný je názor na podíl tuku viscerálního, ve kterém v případě IL-8 nebyly zaznamenány změny exprese v souborech žen s GDM-I a GDM-D proti kontrolám. Expresce IL-6 byla u GDM-D nižší než u kontrol (4,74x, $P=0,029$) a spíše vyšší u GDM-I (2,66x, $P=0,102$). Genová exprese IL-6 byla ve visc. tuku u žen s GDM-I 12,66x vyšší než u skupiny s GDM-D ($P=0,004$), zatímco exprese CD68 byla u GDM-I proti GDM-D 1,46x nižší ($P=0,011$); ani u jedné skupiny s GDM nebyl signifikantní rozdíl v expresi CD68 proti kontrolám (Tab. 21).

Podle práce Mohamed-Ali et al. expresi a uvolňování IL-6 z adipocytů zvyšuje noradrenergní stimulace [180] prostřednictvím ADRB3. Z publikovaných výsledků vyplývá, že zvýšení cirkulujícího IL-6 při obezitě je důsledkem jeho zvýšené produkce adipocyty a nikoliv makrofágy. Tento fakt podporují i naše výsledky nejen na úrovni zvýšené exprese IL-6 s.c. tukovou tkání, ale i zvýšení exprese jeho regulátoru – ADRB3 v s.c. tukové tkáni (Tab. 16) prokázané pomocí expresních arrays.

Ovlivnění genové exprese LEP (leptinu), dalšího základního adipokinu, v subkutánním tuku je v literatuře popsáno u estrogenní stimulace [122], která jeho expresi zvyšuje. Vzájemné

korelace mezi sérovými koncentrací E2 a LEP, ani expresí LEP v s.c., visc. tuku a placentě však nebyly na vyšetřovaném souboru nalezeny. Zvýšení exprese LEP v tukové tkáni je také popsáno po působení cytokinů – IL-1 β a TNF α [181]. Stejná práce naopak nepotvrdila, že by se na regulaci exprese a uvolňování LEP podílely IL-6 a IL-8.

Z našich výsledků vyplývá, že exprese LEP ve visc. tuku je v době porodu nižší než jeho exprese jak s.c. tukem, tak i placentou (Obr. 24 B). Přesto právě pouze ve viscerální tukové tkáni bylo signifikantní zvýšení exprese LEP u GDM-I ve srovnání se zdravými těhotnými ($P=0,015$, Obr. 26, Tab. 19). I přes to, že ve vyšetřovaných tkáních nebylo zaznamenáno mnoho výrazných změn exprese LEP, byly zjištěno statisticky významné zvýšení jeho sérových koncentrací ve skupině těhotných s GDM-I ($P=0,041$, Tab. 25) proti kontrolám.

V expresi resistinu, *RETN*, nebyly v žádné z vyšetřovaných tkání nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi kontrolní skupinou a GDM-I, byly u těhotných s GDM-I jeho sérové koncentrace vyšší než u kontrol, ve skupině GDM-D byly naopak překvapivě nižší než v kontrolní skupině (Tab. 25). Tyto nalezené diskrepance mezi genovou expresí resistinu v tukové tkáni a jeho sérovými koncentracemi nejsou v naší práci popsány ojedinele, jejich příklady jsou shrnuty v publikaci Hotamisligil GS z roku 2003 [133]. Uspokojivé vysvětlení těchto rozdílů není dodnes nalezeno.

Dalším adipokinem je *PAI1*. Je referována jeho vyšší produkce ve visc. tuku než v tuku subkutánním [1]. Tento nález jsme potvrdili i my v naší studii, kdy exprese PAI1 je ve visc. tuku přibližně 10x vyšší, než v tukové tkáni subkutánní. Nejvyšší exprese PAI1 byla ovšem nalezena v placentě (ještě >10x vyšší než ve visc. tuku, Obr. 37). PAI1 se řadí se spíše do skupiny adipokinů s působením proti účinkům zprostředkovaným inzulinem, a jeho zvýšené sérové koncentrace jsou popsány u obézních. Z literatury je známo zvýšení jeho exprese v 3T3-L1 adipocytech po stimulaci IL-6 a GH [151].

Expresí PAI1 byla v s.c. tuku proti kontrolní skupině signifikantně zvýšená u žen s GDM-I ($P=0,016$, Obr. 38, Tab. 24), u kterých byla nalezena také upregulace IL-6, což v realitě biologických vzorků potvrzuje nálezy z *in vitro* studie publikované v literatuře [151].

Za klíčová enzym je považována, jak již bylo diskutováno v úvodu, inzulináza. Zvýšení exprese genu pro *IDE* v kultivovaných buňkách vedlo ke zvýšení degradace inzulinu a aplikace specifické protilátky proti IDE do buněk naopak proces degradace inzulinu utlumila [21]. Byla také prokázána genetická asociace polymorfizmů v genu pro IDE s DM 2. typu [182, 183]. Existují zvířecí modely diabetu – GK laboratorní potkani, s klinickým obrazem

diabetu mellitu 2. typu (hyperinzulinémie a hyperglykémie), u kterých byla popsány polymorfizmy v genu pro IDE (mají tzv. GK alelu charakterizovanou přítomností dvou missence mutací H18R a A890V) snižující jeho enzymatickou účinnost při degradaci inzulínu, která je považována za příčinu rozvoje hyperinzulinémie [184, 185]. Na myším modelu s deletovanými oběma alelami pro IDE byla prokázána elevaci sérových koncentrací inzulínu a zvýšená inzulínová rezistence – symptomy charakteristické pro rozvoj diabetu mellitu [17]. Dalším zvířecím modelem diabetu mellitu jsou myši se zaklonovanou siRNA proti inzulínu a současně se zaklonovaným genem pro lidskou inzulinázu [186]. U těchto myší dochází ke snížení sekrece inzulínu (siRNA interferencí) a současně k jeho zvýšené degradaci (zvýšením exprese lidské inzulinázy) a ke snížení glukózové tolerance [186]. Naše zjištění je spíše v souladu s posledním uvedeným myším modelem inzulínové rezistence – u těhotných s GDM-D jsme popsali výrazné a signifikantní zvýšení genové exprese IDE na úrovni mRNA jak v s.c., tak ve visc. tukové tkáni ($P=0,048$, resp. $P=0,002$; Obr. 33, Tab. 22).

IRSs – substráty inzulínového receptoru jsou významnými mediátory přenosu signálu po stimulaci inzulínového receptoru ligandem. Z našich výsledků je patrné, že i když v literatuře nejčastěji diskutovaným IRS je IRS1 (OMIM 147543), je u těhotných ve všech námi vyšetřovaných tkáních jednoznačně nejvíce exprimovaným substrátem inzulínového receptoru IRS2 (OMIM 600797) (Obr. 18, Obr. 20). Protože již na základě expresních arrays byly u tohoto nejvíce exprimovaného IRS nalezeny také signifikantní rozdíly v genové expresi mezi těhotnými s GDM a zdravými kontrolami, zaměřili jsme se při detailnějším vyšetřování genové exprese metodou qPCR právě na IRS2. Z našich výsledků vyplývá, že exprese IRS2 je signifikantně snížena u žen s GDM-I, a to jak v subkutánní, tak ve viscerální tukové tkáni ($P=0,018$, resp. $P=0,016$), i když velikost downregulace je menší než dvojnásobná (Obr. 33, Tab. 22). V literatuře již byla popsána přítomnost downregulace genové exprese IRS2 v souvislosti se stavem inzulínové rezistence, DM 2. typu a GDM [187, 188], avšak bylo také popsáno snížení exprese IRS2 po působení inzulínu [189]. Z dosud publikovaných a bohužel ani z našich výsledků není zřejmé, zda pokles genové exprese IRS2 v tukových tkáních u žen s GDM kompenzovaným dietou existuje primárně nebo zda je tento jev přítomen až po terapii inzulínem.

V expresi genů rpo GLUT3 a GLUT4 nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi ženami s GDM a zdravými kontrolami.

LIPE, hormon senzitivní lipáza, je klíčovým enzymem lipolýzy probíhající v adipocytech. Ovlivňování její aktivity (stav fosforylace / defosforylace) je pod hormonální regulací [49], jak bylo diskutováno v úvodu, inzulín LIPE defosforyluje, tedy inaktivuje. V naší práci jsme hodnotili genovou expresi této lipázy na úrovni mRNA ve všech vyšetřovaných tkáních. Nejvíce je exprimována v tukové tkáni subkutánní, méně ve viscerální a nejméně v placentě (Obr. 32). Zajímavý je, v kontextu útlumu funkce LIPE jako důsledku působení inzulínu na tukovou tkáň, nález výrazného snížení LIPE exprese u žen s GDM, nejvíce v souboru GDM-D v s.c. tukové tkáni (5,5x, $P=0,047$; Obr. 33, Tab. 22). U stavu inzulínové rezistence, resp. rozvinutého DM 2. typu, bývá také popisována elevace sérových koncentrací FFA, které je vysvětlováno právě chybějícím inhibičním účinkem inzulínu na lipolýzu v adipocytech [190]. Ovšem již od identifikace LIPE byly poruchy v její expresi či posttranslační modifikace považovány za možnou příčinu rozvoje obezity [49]. Bylo popsáno snížení exprese LIPE u obézních proti štíhlým kontrolám v subkutánní tukové tkáni [191]. Regulace genové exprese LIPE *in vivo* není známa. Naše výsledky naznačují, že snížení genové exprese LIPE by mohlo být pojátkem mezi stavem inzulínové rezistence a současně se vyskytující obezitou – kumulace TAG a DAG v adipocytech v důsledku nedostatečné lipolýzy kvůli poklesu exprese hlavního lipolytického enzymu v tukové tkáni. Ověření tohoto předpokladu vyžaduje další výzkum, ovšem pro jeho podporu by mohla hovořit práce Agustssona et al. z roku 2007, ve které autoři popsali pokles genové exprese LIPE v s.c. tukové tkáni u onkologických pacientů s kachexií nádorové etiologie [192], tedy stavu tukové tkáně existujícím na druhém pólu, než je obezita.

IGFBP1 (insulin-like growth factor binding protein 1, OMIM 146730), známý také jako placentární protein 12, patří do skupiny transportních proteinů pro IGF-I a IGF-II. Biologické účinky IGF-I jsou zejména ve stimulaci buněčného růstu a diferenciaci, ale jsou popsány také jeho inzulínu podobné účinky, tedy usnadnění transportu glukózy intracelulárně, zvýšení lipogeneze a pokles lipolýzy v adipocytech [193]. Hlavním transportním proteinem pro oba IGF je u dospělých lidí IGFBP3 (prenatálně zejm. IGFBP2), ale na dynamické regulaci množství volného, tedy biologicky aktivního IGF, se podílí právě IGFBP1, který svou vazbou s IGF brání jeho interakci s IGF receptorem [193], čímž také snižuje účinek IGF při ovlivňování funkce adipocytů [194]. Byly popsány zvýšené sérové koncentrace IGFBP1 ve fetální krvi u těhotenství komplikovaného intrauterinní růstovou retardací (IUGR) z důvodu insuficience placenty a intrauterinní fetální hypoxie a autoři této práce se kloní k názoru, že IUGR je zapříčiněna právě sekvestrací IGF vazbou s IGFBP1 [195]. Heald et al. ve své

práci popsali, že snížené sérové koncentrace IGFBP1 u pacientů s DM 2. typu asociují s rozvojem hypertenze, a to zejména pokles fosforylované frakce IGFBP1, která ještě snadněji interaguje s IGF než frakce nefosforylovaná [196].

V naší práci jsme potvrdili expresi IGFBP1 v placentě i ve viscerální tukové tkáni, překvapivým nálezem ovšem byla jednoznačně (řádově 10 – 100x) vyšší genová exprese IGFBP1 ve visc. tuku než v placentě (Obr. 37 B). Současně s tímto nálezem jsme také zaznamenali výraznou statisticky významnou downregulaci jeho exprese ve visc. tuku u GDM-I proti zdravým těhotným (29,41x, $P=0,006$), zatímco v placentě nebyly významné změny exprese IGFBP1 zaznamenány (Obr. 38, Tab. 24). Exprese IGFBP1 viscerální tukovou tkání korelovala negativně s BMI p.p. ($R=-0,456$, $P=0,0285$), sérovými koncentracemi maternálního resistinu ($R=-0,451$, $P=0,0305$) a glykemií ($R=-0,425$, $P=0,0429$) a pozitivně se sérovými koncentracemi ADIPOQ normalizovanými podle BMI ($R=0,485$, $P=0,019$). Na vyšetřovaném souboru byla sice průměrná hodnota sérových koncentrací celkového IGFBP1 nižší u žen s GDM, zejm. s GDM-I, tyto změny však byly zcela statisticky nevýznamné. Statisticky významný vztah nebyl nalezen ani mezi genovou expresí IGFBP1 ve visc. tuku nebo placeně a jeho sérovou koncentrací. I přes nedostatečnou statistickou významnost změn sérových koncentrací IGFBP1 u žen s GDM proti zdravým kontrolám v době porodu lze považovat viscerální tukovou tkáň za významný zdroj tohoto vazebného proteinu a námi zjištěné skutečnosti jsou v souladu s výsledky progresivní studie publikované autory Qiu et al. z roku 2005, ve které jsou snížené sérové koncentrace IGFBP1 a IGF-I stanovované ve 13. týdnu gestace asociovány s vyšším rizikem rozvoje GDM v probíhající graviditě [197].

NO, oxid dusnatý je signální molekula s mnoha funkcemi, které jsou tkáňově specifické. V tukové tkáni je NO produkován preadipocyty, zralými adipocyty, vaskulárními endoteliálními buňkami i buňkami hladkých svalů v cévní stěně a má antilipolytické účinky a současně je NO silný vazodilatátor [198]. Za produkci NO v tukové tkáni odpovídají endoteliální NO syntáza (eNOS) přítomná v buňkách cévního endotelu a v adipocytech NO syntáza indukibilní (iNOS), známá také pod názvem NOS2A (OMIM 163730), kterou mohou po patřičné stimulaci exprimovat všechny buňky – známá je stimulace exprese NOS2A prostřednictvím cytokinů a bakteriálních lipopolysacharidů [191]. V naší práci jsme prokázali více než dvojnásobné zvýšení exprese NOS2A na hodnocené na úrovni mRNA u všech typů GDM ve viscerálním tuku i v placentě proti zdravým těhotným, ale signifikantní byla tato změna exprese pouze ve visc. tuku u skupiny s GDM-I ($P=0,028$; Obr. 38, Tab. 24).

Bezpochyby zajímavým nálezem je exprese prolaktinu, *PRL* (OMIM 176760) ve viscerální tukové tkáni (Obr. 27). Dosud bylo známo, že u lidí je prolaktin kromě pituitárního původu produkován také mimo CNS – popsána byla jeho produkce deciduou, lymfocyty, prostatou a prsním tukem [199] a v případě nepituitární produkce působí jako cytokin [200]. U prolaktinu byly v letošním roce mimo jeho primárních funkcí spojených s přípravou mammy na laktaci popsány také jeho účinky na β -buňky pankreatu, kde bylo po jeho působení popsáno zvýšení počtu těchto buněk i zvýšení sekrece inzulínu [201, 202]. Dále jsme na námi vyšetřovaném souboru porozovali výraznou (14,93x) a statisticky signifikantní ($P=0,008$) downregulaci jeho genové exprese ve visc. tuku u žen s GDM-I (Obr. 28, Tab. 20). Tyto lokální změny exprese ve viscerální tukové tkáni ovšem nekorelovaly s celkovými koncentracemi prolaktinu v mateřském organizmu, což podporuje spíše domněnku o jeho parakrinním působení v případě periferní produkce. Přímé účinky PRL na zralé adipocyty nebyly dosud uspokojivě popsány.

LDLR je receptor pro LDL partikule (OMIM 606945). Exprese LDLR byla v námi vyšetřovaném souboru proti zdravým těhotným v s.c. tuku signifikantně zvýšena u žen s GDM-I i GDM-D ($P=0,008$, resp. $P=0,003$, Obr. 35, Tab. 23). Zvýšení LDLR v s.c. tukové tkáni při GDM může být časnou známkou nedostatečného zásobení adipocytů s.c. tukové tkáně glukózou, které je kompenzováno zvýšenou poptávkou adipocytů po lipidech získávaných jejich redistribucí cestou lipoproteinů syntetizovaných v játrech.

Údaje z posledních let ukazují, že *ESR1* a *ESR2* modulují expresi genů ovlivňujících inzulínovou senzitivitu a intracelulární transport glukózy [203] u pacientů s DM 2. typu. Současné epidemiologické studie potvrzují význam alterace ESRs na vzniku DM 2. typu [204]. Z vyšetření genové exprese v naší práci překvapivě vyplývá významně vyšší podíl ESR2 na expresi v porovnání s ESR1 (Obr. 34). Statisticky signifikantní snížení exprese u žen s GDM-D bylo zaznamenáno v s.c. tukové tkáni u obou ER, zatímco u žen s GDM-I bylo nalezeno významné zvýšení expres ESR2. Předpokládá se, že estrogení stimulace má protektivní vliv na vznik diabetických komplikací [205, 206]. Naše výsledky ukazují, že u žen s pokročilejší formou GDM dochází také k výraznějším poruchám exprese ERs. Tato změna však nastává v námi sledovaném souboru pouze ve s.c. tukové tkáni a nebyla zaznamenána ani v placentě ani ve viscerální tukové tkáni.

6 SOUHRN

Dizertační práce se zabývá studiem možného podílu tukové tkáně na ovlivnění inzulínové senzitivity prostřednictvím svých působků – adipokinů, a to zejména u těhotných žen s klinicky rozvinutým gestačním diabetem mellitem (GDM). Byla tvořena dvěma základními částmi: První se věnovala charakterizaci změn sérových koncentrací jednoho ze základních adipokinů – adiponectinu – v souboru šesti žen během celého fyziologicky probíhajícího menstruačního cyklu. Druhá část byla zaměřena na studium změn genové exprese produktů tukové tkáně u těhotných s GDM oproti zdravým těhotným (14 vs. 13 žen). Sledována byla exprese adipokinů a jejich receptorů (ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2, LEP, RETN, TNF α , CFD a PAI1), a dále genů s prokázanou či předpokládanou účastí na etiopatogenezi GDM a DM 2. typu ve vzorcích placenty, subkutánní a viscerální tukové tkáni získaných během operačního porodu. Změny genové exprese byly hodnoceny dvěma metodami: Na vybraném podsouboru žen s GDM a kontrol byly charakterizovány rozdílně exprimované geny v placentě, subkutánní a viscerální tukové tkáni pomocí expresních arrays zaměřených na signální dráhu inzulínového receptoru. Vybrané geny s rozdílnou expresí v arrays a některé další dlouhodobě studované regulátory inzulínové senzitivity byly následně analyzovány pomocí qPCR na celém souboru těhotných žen. Výsledky změn v genové expresi byly korelovány s vyšetřeními sérovými koncentracemi sledovaných parametrů (adiponectin, leptin, resistin, inzulín, C-peptid, glukóza, glykovaný hemoglobin, IGF1, IGFBP1, TAG, prolaktin, estradiol) z periferní žilní maternální a pupečnickové krve odebraných při porodu.

V naší práci jsme charakterizovali změny adiponectinemie v průběhu menstruačního cyklu u zdravých žen. Ukázali jsme, že přes podstatné individuální kolísání koncentrací ADIPOQ v séru nejsou tyto rozdíly ovlivněny změnami v koncentracích pohlavních hormonů během fyziologicky probíhajícího menstruačního cyklu.

Na základě vyšetření 112 genů v iniciálním souboru pomocí expresních arrays bylo identifikováno 26 genů s rozdílnou expresí alespoň v jedné tkáni. Kromě genů zapojených zejména v signálně transdukční cestě postreceptorové aktivace inzulínového receptoru (Ras-Raf a MAP-kináz), byly geny se signifikantně změněnou expresí zahrnuty do kvantifikace exprese pomocí qPCR na celém souboru studovaných osob. Kvantifikace genové exprese u 27 studovaných genů (za použití 3 house-keeping genů) metodou qPCR prokázala statisticky signifikantní změny u 17 z nich (Tabulka 27).

Tabulka 27. Přehled statisticky významných změn ($P < 0,05$) genové exprese sledovaných genů ve skupinách těhotných s gestačním diabetem mellitem kompenzovaným inzulínem (GDM-I) nebo pouze dietou (GDM-D) proti zdravým těhotným kontrolám v době porodu v subkutánní (s.c.) a viscerální (visc.) tukové tkáni a v placentě. + zvýšení exprese $< 2x$; +++ zvýšení exprese $> 2x$; - snížení exprese $< 2x$; --- snížení exprese $> 2x$ proti kontrolám

gen (mRNA)	s.c. tuková tkáň		visc. tuková tkáň		placenta	
	GDM-I	GDM-D	GDM-I	GDM-D	GDM-I	GDM-D
Adiponectinový receptor 2 (ADIPOR2)				+		
Leptin (LEP)			+++			
Lidský placentární laktogen (CSH1)						---
Prolaktin (PRL)			---			
Adipsin (CFD)						+++
Il-6	+++			---		
Il-8	+++					
CD68		---				
Inzulín-receptor substrát 2 (IRS2)	-		-			
Inzulináza (IDE)		+++		+++		-
Hormon-senzitivní lipáza (LIPE)		---				
LDL receptor (LDLR)	+++	+++				
Estrogenní receptor 1 (ESR1)	-					
Estrogenní receptor 2 (ESR2)	-	+				
Inhibitor aktivátoru plasminogenu (PAI1)	+					
IGF vazebný protein 1 (IGFBP1)			---			
Inducibilní NO syntáza (NOS2A)			+++			

Z hodnocených sérových koncentrací byly u všech těhotných proti netěhotným ženám signifikantně zvýšené sérové koncentrace inzulínu, triacylglycerolů, prolaktinu a estradiolu a signifikantně nižší sérové koncentrace adiponectinu.

V těhotenství se v závislosti na přítomnosti GDM signifikantně lišily proti zdravým těhotným sérové koncentrace leptinu, resistinu a glukózy a % glykovaného hemoglobinu.

Geny uvedené v tabulce 27, v jejichž expresi byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi pacientkami s GDM a zdravými těhotnými zahrnují ve většině případů geny, které byly až dosud v souvislosti s inzulínovou rezistencí diskutovány poměrně ojediněle a pro zhodnocení významnosti jejich funkce v etiopatogenezi diabetu mellitu, resp. GDM jako modelové situace časné fáze rozvoje inzulínové rezistence, je nutný další výzkum.

Získané výsledky naznačují, že v rozvoji GDM má viscerální a subkutánní tuková tkáň odlišnou úlohu. Změny provázející GDM se projevují i na odlišném expresním vzorci buněk syncytiotrofoblastu. Třebaže vysvětlení všech zaznamenaných změn není možné shrnout do jednoznačných stanovisek formulujících jejich podíl na vzniku a rozvoji GDM, domníváme se, že výsledky této poměrně unikátní studie přinášejí zajímavý pohled na změny doprovázející rozvoj GDM a jeho vztahu k jak k obezitě tak DM 2. typu a budou stimulem pro další výzkum nejen naší pracovní skupiny.

7 SUMMARY

This work deals with the role of adipose tissue-derived hormones – adipokines in the development of insulin resistance in pregnant women with gestational diabetes mellitus (GDM). The study consists of two parts. In the first one, the characterization of changes in concentrations of circulating adiponectin – the most abundant adipokine – during menstrual cycle in healthy women was performed. The second part was focused on the changes of gene expression in pregnant women with GDM relative to healthy pregnant controls (14 vs. 13 subjects). Specific attention was focused on adipokines and their receptors (ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2, LEP, RETN, TNF α , CFD a PAI1) as well as other genes potentially contributing to the etiopathogenesis of GDM in the samples of placenta, subcutaneous, and visceral adipose tissues obtained during surgical delivery.

The changes of gene expression were assessed by the two approaches: Firstly, the gene expression of insulin signaling pathway regulators was characterized using expression arrays in a limited subset of samples from GDM and control subjects. Secondly, the expression of genes that differed most significantly in GDM vs. control group in arrays, together with other genes of involved in the regulation of insulin sensitivity, were analyzed using qPCR in the entire study population. The results of gene expression changes were correlated with the concentrations of relevant circulating parameters (adiponectin, leptin, resistin, insulin, C-peptide, glucose, glycosylated hemoglobin, IGF1, IGFBP1, triglycerides, prolactin, and estradiol) measured in peripheral maternal and umbilical blood collected during delivery.

We conclude that changes in sex hormones during the menstrual cycle do not affect total circulating adiponectin levels in healthy women. Therefore, the differences in insulin sensitivity in various phases of the menstrual cycle are not due to changes of circulating adiponectin levels.

Using the insulin signaling pathway-focused arrays we have characterized 26 out of 112 analyzed genes with significantly changed gene expression in at least one of analyzed tissues of GDM patients compared to healthy controls. Besides the genes involved in postreceptor insulin signaling (Ras-Raf a MAP-kinases pathway), the differently expressed genes were analyzed by qPCR in cohorts of GDM and control pregnant women. Statistically significant differences in gene expression were found in 17 out of 27 qPCR-analyzed genes (Table 28).

Table 28. The table describes the statistically significant results ($P < 0,05$) of qPCR gene expression analysis in groups of GDM patients comparing to healthy women. Subgroups of dietary-compensated gestational diabetes mellitus (GDM-D) and gestational diabetes mellitus compensated by insulin treatment (GDM-I) in time of delivery are described.

Gene (mRNA)	s.c. adipose tissue		visc. adipose tissue		placenta	
	GDM-I	GDM-D	GDM-I	GDM-D	GDM-I	GDM-D
Adiponectin receptor 2 (ADIPOR2)				+		
Leptin (LEP)			+++			
Human placental lactogene (CSH1)						---
Prolactin (PRL)			---			
Adipsin (CFD)						+++
Il-6	+++			---		
Il-8	+++					
CD68		---				
Insulin-receptor substrate 2 (IRS2)	-		-			
Insulinase (IDE)		+++		+++		-
Hormone-sensitive lipase (LIPE)		---				
LDL receptor (LDLR)	+++	+++				
Estrogen receptor 1 (ESR1)	-					
Estrogen receptor 2 (ESR2)	-	+				
Plasminogene activator inhibitor 1 (PAI1)	+					
IGF binding protein 1 (IGFBP1)			---			
Inducible NO synthase (NOS2A)			+++			

+ Increased expression $< 2x$; +++ increased expression $> 2x$

- Decreased expression $< 2x$; --- decreased expression $> 2x$ comparing to controls.

Significant elevations of insulin, triglycerides, prolactin, and estradiol serum concentration and decrease in serum concentration of adiponectin were detected in all pregnant women comparing to non-pregnant controls. Serum concentrations of leptin, resistin, glucose and glycosylated hemoglobin were significantly higher in patients with GDM relative to healthy pregnant women.

In the most of genes described in Table 28 the significant relevancy to insulin-resistance status development has been discussed rather sporadically and without cross-regulations. Therefore it seems to be necessary to focus on them in future studies.

The results indicate that visceral and subcutaneous adipose tissues play different roles in the pathogenesis of GDM. Moreover, the differences in expression pattern of syncytiotrophoblast reflect alterations in GDM patients, as well.

Although further studies are needed to fully characterize the contribution of respective gene expression changes to GDM development the results of our work may serve as an important and innovative background for further studies of GDM and its pathogenetic proximity to type 2 DM and/or obesity.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3T3-L1	- Buněčná linie myšších adipocytů
ACC	- Acetyl-CoA-karboxyláza
ACOG	- Americká klasifikace gynekologů a porodníků
ACTH	- Adenokortikotropní hormon
ADIPOQ	- Adiponectin (Acrp30, GBP28, a APM-1)
ADIPOR1	- Adiponectinový receptor 1
ADIPOR2	- Adiponectinový receptor 2
ADRB3	- Adrenergický receptor β3
AK	- Aminokyseliny
AKT	- V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
PKB	- Proteinkináza B
AMPK	- 5'-AMP-aktivované proteinové kinázy
ANG	- BCL2-like 1
ASM	- Kyselá sfingomyelináza
ASP	- Acylation stimulating protein, C3a-des-Arg
ATGL	- Adipocytární TAG lipáza
B2M	- β-2-mikroglobulin
BCL2L1	- BCL2-like 1 (BclX _L)
BMI	- Body mass index
C/EBP	- CCAAT enhancer-binding proteiny
C/EBPB	- CCAAT enhancer-binding protein β
C1q	- Complement component 1q
CART	- Cocaine-amphetamine-regulated transcript
CD68	- CD68 (Macrosialin)
cDNA	- Komplementární DNA
CFD	- Adipsin (DF)
CRH	- Kortikotropin-releasing hormon
CRHBP	- CRH binding protein
CRK	- V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog
cRNA	- Komplementární RNA
CRP	- C-reaktivní protein
CSA	- Choriový somatotropin A (CSH1, hPL)
CSH1	- Choriový somatotropní hormon 1 (hPL, CSA)
CSH2	- Choriový somatotropní hormon 2
CSL	- Choriovému somatotropinu podobný hormon
DD	- Death domain
ddH ₂ O	- Redestilovaná H ₂ O
DED	- Death effector domain
DGAT	- Diacylglycerolacyltransferáza
DM	- Diabetes mellitus
DR2	- Death receptor 2
DR3	- Death receptor 3
dsDNA	- Dvouřetězová DNA
DUSP14	- Dual specific phosphatase 14 (MAP-kinase phosphatase 6).
E2	- Estradiol
Ef	- Efektivita PCR
EIF4E	- Eukaryotic translation initiation factor 4E
ELA2	- Leukocytární elastáza
ERK	- Extracellular signal-regulated kinase
ESR1	- Estrogenní receptor 1 (ESRα)
ESR2	- Estrogenní receptor 2 (ESRβ)
FADD	- Fas-associated death domain
FasR	- Fas receptor,
FBP1	- Fruktóza-1,6-bisfosfatáza 1
FFA	- Volné mastné kyseliny
FFA LEPR	- Leptinový receptor (OB-R)
FIZZ3	- Found in inflammatory zone (rezistin)
FLICE	- FADD-like ICE (prokaspáza-8)
FSH	- Folikulo-stimulační hormon
G6PC	- Glukóza-6-fosfatáza, katalytická podjednotka
GAD	- Glutamátdekarboxyláza
GAPDH	- Glyceraldehydfosfátdehydrogenáza
GCSF	- Glynulocyte-colony stimulating factor
GDM	- Gestosý diabetus mellitus

GDM-D	- GDM kompenzovaný dietou
GDM-I	- GDM kompenzovaný inzulínoterapií
GEA Suite	- GEArray Expression Analysis Suite
GH	- Growth hormon (růstový hormon)
GHN	- Growth hormone normal
GH-RH	- Growth hormone releasing-hormone
GHV (hPGH)	- Growth hormone variant (hPGH)
Glc	- Glukóza
GLUT 1	- Glukózový transportér 1 (SLC2A1)
GLUT 2	- Glukózový transportér 2 (SLC2A2)
GLUT3	- Glukózový transportér 3 (SLC2A3)
GLUT4	- Glukózový transportér 4 (SLC2A4)
GnRH	- Gonadotropin releasing hormon
GPD1	- Glycerol-3-fosfátdehydrogenáza 1 (solubilní)
GSK3B	- Glykogensyntáza-kináza 3 β
HCG	- Lidský choriový gonadotropin
HDL	- High density of lipoproteins
HK	- House-keeping geny
HMW	- High molecular weight
HOMA index	- Homeostasis Model Assesment
hPGH	- Human placental growth hormone (GH2)
hPL	- Lidský placentární laktogen (CSH1, CSA)
HSL	- Hormon senzitivní lipáza (HSL)
IC	- Intracelulární
ICE	- Interleukín-konvertující enzym
IDE	- Inzulínáza
IGF	- Insulin-like growt factor
IGF2	- Insulin-like growt factor 2 (Somatomedin A)
IGFBP1	- IGF vazebný protein 1
IL-1,	- Interleukin 1
IL-10	- Interleukin 10
IL-6	- Interleukin-6
IL-8	- Interleukin 8
INSL3	- Insulin-like 3 (Leydig cell)
INS	- Inzulín
INSR	- Inzulínový receptor
iPLA2	- Calcium-independent phospholipase A2ζ
IR	- Inzulínová rezistence
IRS	- Inzulín receptor substrát
IRS2	- Inzulín-receptor substrát 2
IRS4	- Inzulín-receptor substrát 4
IκB	- Inhibitor nukleárního faktoru κB
JAK2	- Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase)
kb	- Kilobáze
KRAS	- Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LDLR	- LDL receptor
LEP	- Leptin
LEPR a-f	- Sestřihové varianty LEPR
LH	- Luteinizační hormon
LIPE	- Hormon senitivní lipáza (HSL)
LMW	- low molecular weight
LPH	- Lipotropní hormon
MAP2K1	- Mitogen-activated protein kinase kinase 1
MAPK	- Mitogen-activated protein kinase
MeV	- Multi Experiment Viewer
MCH	- Melanin-concentrating hormon
MKNK1	- MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1
MMW	- Middle-molecular weight
MODY	- Maturity-onset diabetes of the young
MSH	- Melanocyty stimulující hormon
NFκB	- Nukleární faktor κB
NOS2A	- Inducibilní NO syntáza 2A
NPY	- Neuropeptid Y
NSM	- Neutrální sfingomyelináza
oGTT	- Orální glukózový toleranční test
OMIM	- Online Mendelian Inheritance in Man
PAI1	- Inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (SERPINE1)
PAK	- P21-activated kinase
PBGD	- Porfobilinogensyntáza
PCK2	- P-enkefaliny-aktivující kináza 2

PCR	- Polymerázová řetězová reakce
pdb	- Protein database (www.pdb.org)
PI3K	- Fosfatidylinositol-3-kináza
PIK3CA	- Fosfatidylinositol-3-kináza, katalytická podjednotka α
PIK3CB	- Fosfatidylinositol-3-kináza, katalytická podjednotka β
PIP	- Fosfatidylinositolfosfát
POMC	- proopi melanokortikotropní hormon (proopi melanocortin)
PPAR- α	- Peroxisome proliferator-activated receptor α
PPAR γ	- Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PPP1CA	- Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform
PRG	- Progesteron
PRKCZ	- Protein kinase C, zeta
PRL	- Prolaktin
qPCR	- Kvantitativní RT-PCR v reálném čase ()
QUICKI	- Quantitative Insulin Sensitivity Check Index
Raf1	- V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
RDS	- Respiratory distress syndrom
RELM	- Resistin-like molecules
RETN	- Resistin
RIN	- RNA integrity number
RIP	- Receptor-interacting protein
RRAS2	- Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2
SAM analýza	- Significance Analysis of Microarrays
SERPINE 1	- PAI1
Shc	- Src homology transforming protein /Src homology domain
SHC1	- SHC transforming protein 1
SLC2A1	- GLUT1
SLC2A2	- GLUT 2
SLC2A3	- GLUT3
SLC2A4	- GLUT4
soB-R	- Solubilní leptinový receptor (LEPR ϵ)
Sos	- Son of sevenless
SOS2	- Son of sevenless homolog 1 (Drosophila)
STAT	- Signal transducers and activators of transcription
T3	- Trijodtyronin
T4	- Thyroxin
TACE	- TNF α konvertujícího enzymu () [1,136].
TAG	- Triacylglycerol
T _{an}	- Anelační teplota
TBG	- Thyroid-binding globulin
TNF-A	- Tumor nekrotizující faktor (TNF α)
TNFR1	- TNF α receptor 1
TNFR2	- TNF α receptor 2
TNF α	- Tumor necrosis faktor α
TOR	- Target of rapamycin
TRADD	- TNFR-associated death domain
TRAF2	- TNFR-associated factor 2
TRH	- Thyreotropin-releasing hormon
TSH	- Thyreotropin
TZD	- Thiazolidiny
VLDL	- Very low density of lipoproteins
VMK	- Volné mastné kyseliny
WHR	- Waist-to-hip circumference ratio

9 LITERATURA

1. HALUZIK M. Tuková tkáň jako endokrinní orgán: její význam při vzniku a rozvoji inzulínové rezistence, diabetu 2. typu a přidružených komplikací. *Trendy soudobé diabetologie (Svazek 8): Galén, Praha, 2003. 190 s. ISBN 8072622420.*
2. ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**(6505): 425-432, 1994.
3. CHANDRAN M, PHILLIPS SA, CIARALDI T, HENRY RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003 Aug ;**26** (8): 62442-2450, 2003.
4. MATSUZAWA Y, FUNAHASHI T, NAKAMURA T. Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci* **892**: 146-154, 1999.
5. KADOWAKI T and YAMAUCHI T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* **26**(3): 439-451, 2005.
6. CASE J, WILLOUGHBY D, HALEY-ZITLIN V, MAYBEE P. Preventing type 2 diabetes after gestational diabetes. *Diabetes Educ* **32**(6): 877-886, 2006.
7. TROUT KK, HOMKO C, TKACS NC. Methods of measuring insulin sensitivity. *Biol Res Nurs* **8**(4): 305-318, 2007.
8. CAHOVA M, VAVRINKOVA H, KAZDOVA L. Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance. *Physiol Res* **56**(1): 1-15, 2007.
9. ASCASO JF, PARDO S, REAL JT, LORENTE RI, PRIEGO A, CARMENA R. Diagnosing insulin resistance by simple quantitative methods in subjects with normal glucose metabolism. *Diabetes Care* **26**(12): 3320-3325, 2003.
10. VALDES CT and ELKIND-HIRSCH KE. Intravenous glucose tolerance test-derived insulin sensitivity changes during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* **72**(3): 642-646, 1991.
11. DEVLIN TM. *Textbook of biochemistry with clinical correlations (4th edition): Wiley-Liss, Inc., New York, USA, 1997. 1186 s. ISBN 0-471-15451-2.*
12. BLUHER M, FASSHAUER M, TONJES A, KRATZSCH J, SCHON MR, PASCHKE R. Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **113**(9): 534-537, 2005.
13. VALERA MORA ME, SCARFONE A, CALVANI M, GRECO AV, MINGRONE G. Insulin clearance in obesity. *J Am Coll Nutr* **22**(6): 487-493, 2003.
14. WHITE MF. Insulin signaling in health and disease. *Science* **302**(5651): 1710-1711, 2003.
15. HOTAMISLIGIL GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**(7121): 860-867, 2006.

16. QIU WQ, WALSH DM, YE Z, VEKRELLIS K, ZHANG J, PODLISNY MB, ROSNER MR, SAFAVI A, HERSH LB, SELKOE DJ. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* **273**(49): 32730-32738, 1998.
17. FARRIS W, MANSOURIAN S, CHANG Y, LINDSLEY L, ECKMAN EA, FROSCH MP, ECKMAN CB, TANZI RE, SELKOE DJ, GUENETTE S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 4162-4167, 2003.
18. BENNETT RG, DUCKWORTH WC, HAMEL FG. Degradation of amylin by insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem* **275**(47): 36621-36625, 2000.
19. KUROCHKIN IV. Insulin-degrading enzyme: embarking on amyloid destruction. *Trends Biochem Sci* **26**(7): 421-425, 2001.
20. COOK DG, LEVERENZ JB, MCMILLAN PJ, KULSTAD JJ, ERICKSEN S, ROTH RA, SCHELLENBERG GD, JIN LW, KOVACINA KS, CRAFT S. Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am J Pathol* **162**(1): 313-319, 2003.
21. QIU WQ and FOLSTEIN MF. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging* **27**(2): 190-198, 2006.
22. KAHN SE, HULL RL, UTZSCHNEIDER KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**(7121): 840-846, 2006.
23. SCHWARTZ MW and PORTE D, Jr. Diabetes, obesity, and the brain. *Science* **307**(5708): 375-379, 2005.
24. HUNTER SJ and GARVEY WT. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med* **105**(4): 331-345, 1998.
25. ČECH E, HÁJEK Z, MARŠÁL K, SRP B, A KOLEKTIV. *Porodnictví (2. přepracované vydání)*: Grada Publishing, Praha, 2006. 550 s. ISBN 80-247-1303-9.
26. DANFORTH DN. *Danforth's Obstetrics and Gynecology (8th Edition)*: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 1999. 988 s. ISBN 0-7817-1206-8.
27. TALMADGE K, BOORSTEIN WR, FIDDES JC. The human genome contains seven genes for the beta-subunit of chorionic gonadotropin but only one gene for the beta-subunit of luteinizing hormone. *DNA* **2**(4): 281-289, 1983.
28. HU L, LYTRAS A, BOCK ME, YUEN CK, DODD JG, CATTINI PA. Detection of placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin-L RNA expression in normal and diabetic pregnancy by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mol Cell Endocrinol* **157**: 131-142, 1999.
29. HANDWERGER S and FREEMARK M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab* **13**(4): 343-356, 2000.
30. BARBOUR LA, SHAO J, QIAO L, PULAWA LK, JENSEN DR, BARTKE A, GARRITY M, DRAZNIN B, FRIEDMAN JE. Human placental growth hormone causes

severe insulin resistance in transgenic mice. *Am J Obstet Gynecol* 2002 Mar ;186 (3):512-7 **186**: 512-517, 2002.

31. MASUZAKI H, OGAWA Y, SAGAWA N, HOSODA K, MATSUMOTO T, MISE H, NISHIMURA H, YOSHIMASA Y, TANAKA I, MORI T, NAKAO K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* **3**(9): 1029-1033, 1997.
32. HENSON MC and CASTRACANE VD. Leptin in pregnancy. *Biol Reprod* **63**(5): 1219-1228, 2000.
33. YURA S, SAGAWA N, ITOH H, KAKUI K, NUAMAH MA, KORITA D, TAKEMURA M, FUJII S. Resistin is expressed in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* **88**(3): 1394-1397, 2003.
34. CHEN HL, YANG YP, HU XL, YELAVARTHI KK, FISHBACK JL, HUNT JS. Tumor necrosis factor alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *Am J Pathol* **139**(2): 327-335, 1991.
35. LAPPAS M, YEE K, PERMEZEL M, RICE GE. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J Endocrinol* **186**(3): 457-465, 2005.
36. CHEN J, TAN B, KARTERIS E, ZERVOU S, DIGBY J, HILLHOUSE EW, VATISH M, RANDEVA HS. Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia* **49**(6): 1292-1302, 2006.
37. KAUTZKY-WILLER A and BANCHER-TODESCA D. [Gestational diabetes]. *Wien Med Wochenschr* **153**(21-22): 478-484, 2003.
38. VĚTR M. Principy terapie diabetu v těhotenství. *Moderní gynekologie a porodnictví* **13**(2): 239-254, 2004.
39. BUCHANAN TA and XIANG AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* **115**(3): 485-491, 2005.
40. CATALANO PM, TYZBIR ED, WOLFE RR, CALLES J, ROMAN NM, AMINI SB, SIMS EA. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am J Physiol* **264**(1 Pt 1): E60-E67, 1993.
41. CATALANO PM, HUSTON L, AMINI SB, KALHAN SC. Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* **180**(4): 903-916, 1999.
42. LOBNER K, KNOPFF A, BAUMGARTEN A, MOLLENHAUER U, MARIENFELD S, GARRIDO-FRANCO M, BONIFACIO E, ZIEGLER AG. Predictors of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes* **55**(3): 792-797, 2006.
43. ROZTOČIL A. Těhotenství komplikované diabetem a patologickým OGTT. *Moderní gynekologie a porodnictví* **12**(2): 323-332, 2003.
44. WAJCHENBERG BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* **21**(6): 697-738, 2000.

45. WAJCHENBERG BL, GIANNELLA-NETO D, DA SILVA ME, SANTOS RF. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* **34**(11-12): 616-621, 2002.
46. FERLAND M, DESPRES JP, TREMBLAY A, PINAULT S, NADEAU A, MOORJANI S, LUPIEN PJ, THERIAULT G, BOUCHARD C. Assessment of adipose tissue distribution by computed axial tomography in obese women: association with body density and anthropometric measurements. *Br J Nutr* **61**(2): 139-148, 1989.
47. SEIDELL JC, OOSTERLEE A, DEURENBERG P, HAUTVAST JG, RUIJS JH. Abdominal fat depots measured with computed tomography: effects of degree of obesity, sex, and age. *Eur J Clin Nutr* **42**(9): 805-815, 1988.
48. KERSTEN S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* **2**(4): 282-286, 2001.
49. HOLM C, KIRCHGESSNER TG, SVENSON KL, FREDRIKSON G, NILSSON S, MILLER CG, SHIVELY JE, HEINZMANN C, SPARKES RS, MOHANDAS T, . Hormone-sensitive lipase: sequence, expression, and chromosomal localization to 19 cent-q13.3. *Science* **241**(4872): 1503-1506, 1988.
50. KRAEMER FB and SHEN WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res* **43**(10): 1585-1594, 2002.
51. HAEMMERLE G, ZIMMERMANN R, HAYN M, THEUSSL C, WAEG G, WAGNER E, SATTLER W, MAGIN TM, WAGNER EF, ZECHNER R. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* **277**(7): 4806-4815, 2002.
52. ZIMMERMANN R, STRAUSS JG, HAEMMERLE G, SCHOISWOHL G, BIRNERGRUENBERGER R, RIEDERER M, LASS A, NEUBERGER G, EISENHABER F, HERMETTER A, ZECHNER R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**(5700): 1383-1386, 2004.
53. JENKINS CM, MANCUSO DJ, YAN W, SIMS HF, GIBSON B, GROSS RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* **279**(47): 48968-48975, 2004.
54. VILLENA JA, ROY S, SARKADI-NAGY E, KIM KH, SUL HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* **279**(45): 47066-47075, 2004.
55. KRALISCH S, KLEIN J, LOSSNER U, BLUHER M, PASCHKE R, STUMVOLL M, FASSHAUER M. Isoproterenol, TNFalpha, and insulin downregulate adipose triglyceride lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* **240**(1-2): 43-49, 2005.
56. TARTAGLIA LA, DEMBSKI M, WENG X, DENG N, CULPEPPER J, DEVOS R, RICHARDS GJ, CAMPFIELD LA, CLARK FT, DEEDS J, . Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**(7): 1263-1271, 1995.

57. HAVEL PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* **53** Suppl 1: S143-S151, 2004.
58. SAITO K, TOBE T, MINOSHIMA S, ASAKAWA S, SUMIYA J, YODA M, NAKANO Y, SHIMIZU N, TOMITA M. Organization of the gene for gelatin-binding protein (GBP28). *Gene* **229**(1-2): 67-73, 1999.
59. SCHAFFLER A, ORSO E, PALITZSCH KD, BUCHLER C, DROBNIK W, FURST A, SCHOLMERICH J, SCHMITZ G. The human apM-1, an adipocyte-specific gene linked to the family of TNF's and to genes expressed in activated T cells, is mapped to chromosome 1q21.3-q23, a susceptibility locus identified for familial combined hyperlipidaemia (FCH). *Biochem Biophys Res Commun* **260**(2): 416-425, 1999.
60. SCHERER PE, WILLIAMS S, FOGLIANO M, BALDINI G, LODISH HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* **270**(45): 26746-26749, 1995.
61. HU E, LIANG P, SPIEGELMAN BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* **271**(18): 10697-10703, 1996.
62. MAEDA K, OKUBO K, SHIMOMURA I, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y, MATSUBARA K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* **221**(2): 286-289, 1996.
63. NAKANO Y, TOBE T, CHOI-MIURA NH, MAZDA T, TOMITA M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)* **120**(4): 803-812, 1996.
64. YAMAUCHI T, KAMON J, ITO Y, TSUCHIDA A, YOKOMIZO T, KITA S, SUGIYAMA T, MIYAGISHI M, HARA K, TSUNODA M, MURAKAMI K, OHTEKI T, UCHIDA S, TAKEKAWA S, WAKI H, TSUNO NH, SHIBATA Y, TERAUCHI Y, FROGUEL P, TOBE K, KOYASU S, TAIRA K, KITAMURA T, SHIMIZU T, NAGAI R, KADOWAKI T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003 Jun 12 ;**423** (6941): 762-769, 2003.
65. BERSTEIN LM. [Hormones of adipose tissue (adipocytokines): ontogenetic and oncologic aspects]. *Adv Gerontol* **16**: 51-64, 2005.
66. BELTOWSKI J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* **9**(2): RA55-RA61, 2003.
67. STEFAN N and STUMVOLL M. Adiponectin--its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res* **34**(9): 469-474, 2002.
68. PAJVANI UB, DU X, COMBS TP, BERG AH, RAJALA MW, SCHULTHESS T, ENGEL J, BROWNLEE M, SCHERER PE. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 2003 Mar 14;**278** (11): 9073-9085, 2003.

69. WONG GW, WANG J, HUG C, TSAO TS, LODISH HF. A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(28): 10302-10307, 2004.
70. SHAPIRO L and SCHERER PE. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* **8**(6): 335-338, 1998.
71. WAKI H, YAMAUCHI T, KAMON J, KITA S, ITO Y, HADA Y, UCHIDA S, TSUCHIDA A, TAKEKAWA S, KADOWAKI T. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* **146**(2): 790-796, 2005.
72. IYENGAR P and SCHERER PE. Adiponectin/Acrp30, an adipocyte-specific secretory factor: physiological relevance during development. *Pediatr Diabetes* **4**(1): 32-37, 2003.
73. HADA Y, YAMAUCHI T, WAKI H, TSUCHIDA A, HARA K, YAGO H, MIYAZAKI O, EBINUMA H, KADOWAKI T. Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* **356**(2): 487-493, 2007.
74. KADOWAKI T, YAMAUCHI T, KUBOTA N, HARA K, UEKI K, TOBE K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* **116**(7): 1784-1792, 2006.
75. PAJVANI UB, HAWKINS M, COMBS TP, RAJALA MW, DOEBBER T, BERGER JP, WAGNER JA, WU M, KNOPPS A, XIANG AH, UTZSCHNEIDER KM, KAHN SE, OLEFSKY JM, BUCHANAN TA, SCHERER PE. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* **279**(13): 12152-12162, 2004.
76. HARA K, HORIKOSHI M, YAMAUCHI T, YAGO H, MIYAZAKI O, EBINUMA H, IMAI Y, NAGAI R, KADOWAKI T. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care* **29**(6): 1357-1362, 2006.
77. FASSHAUER M, KLEIN J, KRALISCH S, KLIER M, LOSSNER U, BLUHER M, PASCHKE R. Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* **558**(1-3): 27-32, 2004.
78. BERG AH, COMBS TP, SCHERER PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002 Mar ;**13**(2): 84-89, 2002.
79. HALUZIK M, PARIZKOVA J, HALUZIK MM. Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. *Physiol Res* **53**(2): 123-129, 2004.
80. GOLDFINE AB and KAHN CR. Adiponectin: linking the fat cell to insulin sensitivity. *Lancet* **362**(9394): 1431-1432, 2003.
81. YAMAUCHI T, KAMON J, MINOKOSHI Y, ITO Y, WAKI H, UCHIDA S, YAMASHITA S, NODA M, KITA S, UEKI K, ETO K, AKANUMA Y, FROGUEL P,

- FOUFELLE F, FERRE P, CARLING D, KIMURA S, NAGAI R, KAHN BB, KADOWAKI T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002 Nov ;**8** (11): 81288-1295, 2002.
82. ZHOU H, SONG X, BRIGGS M, VIOLAND B, SALSGIVER W, GULVE EA, LUO Y. Adiponectin represses gluconeogenesis independent of insulin in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **338**(2): 793-799, 2005.
83. DIEZ JJ and IGLESIAS P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* **148**(3): 293-300, 2003.
84. GAVRILA A, PENG CK, CHAN JL, MIETUS JE, GOLDBERGER AL, MANTZOROS CS. Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 Jun ;**88** (6): 2838-2843, 2003.
85. HARDIE L, TRAYHURN P, ABRAMOVICH D, FOWLER P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* **47**(1): 101-106, 1997.
86. GEISTHOVEL F, JOCHMANN N, WIDJAJA A, HORN R, BRABANT G. Serum pattern of circulating free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in the physiological menstrual cycle. *Fertil Steril* **81**(2): 398-402, 2004.
87. COMBS TP, BERG AH, RAJALA MW, KLEBANOV S, IYENGAR P, JIMENEZ-CHILLARON JC, PATTI ME, KLEIN SL, WEINSTEIN RS, SCHERER PE. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 2003 Feb ;**52** (2): 268-276, 2003.
88. NISHIZAWA H, SHIMOMURA I, KISHIDA K, MAEDA N, KURIYAMA H, NAGARETANI H, MATSUDA M, KONDO H, FURUYAMA N, KIHARA S, NAKAMURA T, TOCHINO Y, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 2002 Sep ;**51**(9): 2734-2741, 2002.
89. BOTTNER A, KRATZSCH J, MULLER G, KAPELLEN TM, BLUHER S, KELLER E, BLUHER M, KIESS W. Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(8): 4053-4061, 2004.
90. ARITA Y, KIHARA S, OUCHI N, TAKAHASHI M, MAEDA K, MIYAGAWA J, HOTTA K, SHIMOMURA I, NAKAMURA T, MIYAOKA K, KURIYAMA H, NISHIDA M, YAMASHITA S, OKUBO K, MATSUBARA K, MURAGUCHI M, OHMOTO Y, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **257**(1): 79-83, 1999.
91. WEYER C, FUNAHASHI T, TANAKA S, HOTTA K, MATSUZAWA Y, PRATLEY RE, TATARANNI PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(5): 1930-1935, 2001.

92. HOTTA K, FUNAHASHI T, BODKIN NL, ORTMAYER HK, ARITA Y, HANSEN BC, MATSUZAWA Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* **50**(5): 1126-1133, 2001.
93. HOTTA K, FUNAHASHI T, ARITA Y, TAKAHASHI M, MATSUDA M, OKAMOTO Y, IWAHASHI H, KURIYAMA H, OUCHI N, MAEDA K, NISHIDA M, KIHARA S, SAKAI N, NAKAJIMA T, HASEGAWA K, MURAGUCHI M, OHMOTO Y, NAKAMURA T, YAMASHITA S, HANAFUSA T, MATSUZAWA Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(6): 1595-1599, 2000.
94. COTE M, MAURIEGE P, BERGERON J, ALMERAS N, TREMBLAY A, LEMIEUX I, DESPRES JP. Adiponectinemia in visceral obesity: impact on glucose tolerance and plasma lipoprotein and lipid levels in men. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(3): 1434-1439, 2005.
95. LENCHIK L, REGISTER TC, HSU FC, LOHMAN K, NICKLAS BJ, FREEDMAN BI, LANGEFELD CD, CARR JJ, BOWDEN DW. Adiponectin as a novel determinant of bone mineral density and visceral fat. *Bone* 2003 Oct ;**33** (4): 646-651, 2003.
96. SPRANGER J, KROKE A, MOHLIG M, BERGMANN MM, RISTOW M, BOEING H, PFEIFFER AF. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003 Jan 18 ;**361** (9353): 226-228, 2003.
97. OWECKI M, MICZKE A, PUPEK-MUSIALIK D, BRYL W, CYMERYYS M, NIKISCH E, SOWINSKI J. Circulating serum adiponectin concentrations do not differ between obese and non-obese caucasians and are unrelated to insulin sensitivity. *Horm Metab Res* **39**(1): 25-30, 2007.
98. MOHLIG M, WEGEWITZ U, OSTERHOFF M, ISKEN F, RISTOW M, PFEIFFER AF, SPRANGER J. Insulin decreases human adiponectin plasma levels. *Horm Metab Res* 2002 Nov -Dec ;**34** (11-12): 655-658, 2002.
99. BOGAN JS and LODISH HF. Two compartments for insulin-stimulated exocytosis in 3T3-L1 adipocytes defined by endogenous ACRP30 and GLUT4. *J Cell Biol* **146**(3): 609-620, 1999.
100. SMITH U, AXELSEN M, CARVALHO E, ELIASSON B, JANSSON PA, WESSLAU C. Insulin signaling and action in fat cells: associations with insulin resistance and type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* **892**: 119-126, 1999.
101. FASSHAUER M, KRALISCH S, KLIER M, LOSSNER U, BLUHER M, KLEIN J, PASCHKE R. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Feb 21;**301** (4): 1045-1050, 2003.
102. FASSHAUER M, KLEIN J, NEUMANN S, ESZLINGER M, PASCHKE R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Jan 25 ;**290** (3): 1084-1089, 2002.

103. FERNANDEZ-REAL JM, PUGEAT M, LOPEZ-BERMEJO A, BORNET H, RICART W. Corticosteroid-binding globulin affects the relationship between circulating adiponectin and cortisol in men and women. *Metabolism* **54**(5): 584-589, 2005.
104. FASSHAUER M, KLEIN J, NEUMANN S, ESZLINGER M, PASCHKE R. Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2001 Oct 26 ;**507**(2): 142-146, 2001.
105. OTT V, FASSHAUER M, DALSKI A, MEIER B, PERWITZ N, KLEIN HH, TSCHOP M, KLEIN J. Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res* 2002 Nov -Dec ;**34** (11-12): 640-645, 2002.
106. AHIMA RS and FLIER JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* **62**: 413-437, 2000.
107. AHIMA RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* **14** Suppl 5: 242S-249S, 2006.
108. LAFONTAN M and VIGUERIE N. Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Curr Opin Pharmacol* **6**(6): 580-585, 2006.
109. SAGAWA N, YURA S, ITOH H, KAKUI K, TAKEMURA M, NUAMAH MA, OGAWA Y, MASUZAKI H, NAKAO K, FUJII S. Possible role of placental leptin in pregnancy: a review. *Endocrine* **19**(1): 65-71, 2002.
110. ARNER P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* 2003 Apr;**14**(3): 137-145, 2003.
111. AHIMA RS, QI Y, SINGHAL NS, JACKSON MB, SCHERER PE. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes* **55** Suppl 2: S154, 2006.
112. AHIMA RS and OSEI SY. Leptin signaling. *Physiol Behav* **81**(2): 223-241, 2004.
113. ZHANG F, BASINSKI MB, BEALS JM, BRIGGS SL, CHURGAY LM, CLAWSON DK, DIMARCHI RD, FURMAN TC, HALE JE, HSIUNG HM, SCHONER BE, SMITH DP, ZHANG XY, WERY JP, SCHEVITZ RW. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* **387**(6629): 206-209, 1997.
114. CHAN JL, BLUHER S, YIANNAKOURIS N, SUCHARD MA, KRATZSCH J, MANTZOROS CS. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes* **51**(7): 2105-2112, 2002.
115. NISWENDER KD and SCHWARTZ MW. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol* **24**(1): 1-10, 2003.
116. PORTE D, Jr., BASKIN DG, SCHWARTZ MW. Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev* **60**(10 Pt 2): S20-S29, 2002.
117. HAVEL PJ. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)* **226**(11): 963-977, 2001.

118. COHEN P, MIYAZAKI M, SOCCI ND, HAGGE-GREENBERG A, LIEDTKE W, SOUKAS AA, SHARMA R, HUDGINS LC, NTAMBI JM, FRIEDMAN JM. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* **297**(5579): 240-243, 2002.
119. FASSHAUER M and PASCHKE R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* **46**(12): 1594-1603, 2003.
120. AHIMA RS and FLIER JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* **11**(8): 327-332, 2000.
121. JEQUIER E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* **967**: 379-388, 2002.
122. FLIER JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* **116**(2): 337-350, 2004.
123. BRADLEY RL, KOKKOTOU EG, MARATOS-FLIER E, CHEATHAM B. Melanin-concentrating hormone regulates leptin synthesis and secretion in rat adipocytes. *Diabetes* **49**(7): 1073-1077, 2000.
124. BRADLEY RL, MANSFIELD JP, MARATOS-FLIER E, CHEATHAM B. Melanin-concentrating hormone activates signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(3): E584-E592, 2002.
125. DORIA A. Adipokine genes and the insulin-resistance syndrome. 2004. International congress series **1253**: 63-71, 2003
126. STEPPAN CM, BAILEY ST, BHAT S, BROWN EJ, BANERJEE RR, WRIGHT CM, PATEL HR, AHIMA RS, LAZAR MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001 Jan 18 ;**409** (6818): 307-312, 2001.
127. BANERJEE RR and LAZAR MA. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J Biol Chem* **276**(28): 25970-25973, 2001.
128. BANERJEE RR and LAZAR MA. Resistin: molecular history and prognosis. *J Mol Med* **81**(4): 218-226, 2003.
129. CHEN J, WANG L, BOEG YS, XIA B, WANG J. Differential dimerization and association among resistin family proteins with implications for functional specificity. *J Endocrinol* **175**(2): 499-504, 2002.
130. PATEL SD, RAJALA MW, ROSSETTI L, SCHERER PE, SHAPIRO L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* **304**(5674): 1154-1158, 2004.
131. BROWN JE, ONYANGO DJ, DUNMORE SJ. Resistin down-regulates insulin receptor expression, and modulates cell viability in rodent pancreatic beta-cells. *FEBS Lett*, 2007.

132. BANERJEE RR, RANGWALA SM, SHAPIRO JS, RICH AS, RHOADES B, QI Y, WANG J, RAJALA MW, POCAI A, SCHERER PE, STEPPAN CM, AHIMA RS, OBICI S, ROSSETTI L, LAZAR MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* **303**(5661): 1195-1198, 2004.
133. HOTAMISLIGIL GS. The irresistible biology of resistin. *J Clin Invest* **111**(2): 173-174, 2003.
134. MCTERNAN CL, MCTERNAN PG, HARTE AL, LEVICK PL, BARNETT AH, KUMAR S. Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet* **359**(9300): 46-47, 2002.
135. FASSHAUER M, KLEIN J, NEUMANN S, ESZLINGER M, PASCHKE R. Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **288**(4): 1027-1031, 2001.
136. SETHI JK and HOTAMISLIGIL GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol* **10**(1): 19-29, 1999.
137. HOTAMISLIGIL GS, SHARGILL NS, SPIEGELMAN BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**(5091): 87-91, 1993.
138. FERNANDEZ-REAL JM and RICART W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* **24**(3): 278-301, 2003.
139. CHEN G and GOEDDEL DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**(5573): 1634-1635, 2002.
140. BAEYENS KJ, DE BONDT HL, RAEYMAEKERS A, FIERS W, DE RANTER CJ. The structure of mouse tumour-necrosis factor at 1.4 A resolution: towards modulation of its selectivity and trimerization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**(Pt 4): 772-778, 1999.
141. KLEIBL Z, RAISOVA M, NOVOTNY J, POHLREICH P, MATOUS B. [Apoptosis and its importance in the development and therapy of tumors (review)]. *Sb Lek* **103**(1): 1-13, 2002.
142. LONG SD and PEKALA PH. Lipid mediators of insulin resistance: ceramide signalling down-regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* **319**(Pt 1): 179-184, 1996.
143. ESTEVE E, CASTRO A, LOPEZ-BERMEJO A, VENDRELL J, RICART W, FERNANDEZ-REAL JM. Divergent relationships among soluble tumor necrosis factor-alpha receptors 1 and 2, insulin resistance, and endothelial function. *Diabetes Care* **29**(6): 1460-1461, 2006.
144. VENDRELL J, BROCH M, FERNANDEZ-REAL JM, GUTIERREZ C, SIMON I, MEGIA A, GALLART L, RICART W, RICHART C. Tumour necrosis factor receptors (TNFRs) in Type 2 diabetes. Analysis of soluble plasma fractions and genetic variations of TNFR2 gene in a case-control study. *Diabet Med* **22**(4): 387-392, 2005.

145. CAWTHORN WP, HEYD F, HEGYI K, SETHI JK. Tumour necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. *Cell Death Differ* **14**(7): 1361-1373, 2007.
146. DE ALVARO C, TERUEL T, HERNANDEZ R, LORENZO M. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem* **279**(17): 17070-17078, 2004.
147. STEPHENS JM, LEE J, PILCH PF. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* **272**(2): 971-976, 1997.
148. HOTAMISLIGIL GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24** Suppl 4: S23-S27, 2000.
149. XU H, UYSAL KT, BECHERER JD, ARNER P, HOTAMISLIGIL GS. Altered tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF-alpha in obesity. *Diabetes* **51**(6): 1876-1883, 2002.
150. BLUHER M, KRATZSCH J, PASCHKE R. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha, angiotensin II, growth hormone, and IGF-I are not elevated in insulin-resistant obese individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* **24**(2): 328-334, 2001.
151. KRALISCH S, KLEIN J, LOSSNER U, BLUHER M, PASCHKE R, STUMVOLL M, FASSHAUER M. Plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion are stimulated by growth hormone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* **253**(1-2): 56-62, 2006.
152. AHREN B, HAVEL PJ, PACINI G, CIANFLONE K. Acylation stimulating protein stimulates insulin secretion. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**(9):1037 -43 271037-1043, 2003.
153. FUGLSANG J, SKJAERBAEK C, FRYSTYK J, FLYVBJERG A, OVESEN P. A longitudinal study of serum adiponectin during normal pregnancy. *BJOG* **113**(1): 110-113, 2006.
154. CATALANO PM, HOEGH M, MINIUM J, HUSTON-PRESLEY L, BERNARD S, KALHAN S, HAUGUEL-DE MOUZON S. Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* **49**(7): 1677-1685, 2006.
155. CORTELAZZI D, CORBETTA S, RONZONI S, PELLE F, MARCONI A, COZZI V, CETIN I, CORTELAZZI R, BECK-PECCOZ P, SPADA A. Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)* **66**(3): 447-453, 2007.
156. RETNAKARAN R, HANLEY AJ, RAIF N, CONNELLY PW, SERMER M, ZINMAN B. Reduced adiponectin concentration in women with gestational diabetes: a potential factor in progression to type 2 diabetes. *Diabetes Care* **27**(3): 799-800, 2004.

157. CSEH K, BARANYI E, MELCZER Z, KASZAS E, PALIK E, WINKLER G. Plasma adiponectin and pregnancy-induced insulin resistance. *Diabetes Care* **27**(1): 274-275, 2004.
158. CASTRACANE VD, HENDRICKX AG, HENSON MC. Serum leptin in nonpregnant and pregnant women and in old and new world nonhuman primates. *Exp Biol Med (Maywood)* **230**(4): 251-254, 2005.
159. HENDLER I, BLACKWELL SC, MEHTA SH, WHITTY JE, RUSSELL E, SOROKIN Y, COTTON DB. The levels of leptin, adiponectin, and resistin in normal weight, overweight, and obese pregnant women with and without preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* **193**(3 Pt 2): 979-983, 2005.
160. MCLACHLAN KA, O'NEAL D, JENKINS A, ALFORD FP. Do adiponectin, TNF α , leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev* **22**(2): 131-138, 2006.
161. WINKLER G, CSEH K, BARANYI E, MELCZER Z, SPEER G, HAJOS P, SALAMON F, TURI Z, KOVACS M, VARGHA P, KARADI I. Tumor necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* **56**(2): 93-99, 2002.
162. KIRWAN JP, HAUGUEL-DE MOUZON S, LEPERCQ J, CHALLIER JC, HUSTON-PRESLEY L, FRIEDMAN JE, KALHAN SC, CATALANO PM. TNF- α is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* **51**(7): 2207-2213, 2002.
163. FLEIGE S, WALF V, HUCH S, PRGOMET C, SEHM J, PFAFFL MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* **28**(19): 1601-1613, 2006.
164. POSPISILOVA S and MAYER J. [A modern method for differential gene expression analysis and its significance for cancer diagnostics and therapy]. *Cas Lek Cesk* **144**(1): 11-17, 2005.
165. TUSHER VG, TIBSHIRANI R, CHU G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5116-5121, 2001.
166. BUSTIN SA and NOLAN T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* **15**(3): 155-166, 2004.
167. PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45-52, 2001.
168. PFAFFL MW, HORGAN GW, DEMPFFLE L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**(9): e36-47, 2002.
169. KATZ A, NAMBI SS, MATHER K, BARON AD, FOLLMANN DA, SULLIVAN G, QUON MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **85**(7): 2402-2410, 2000.

170. KIRWAN JP, HUSTON-PRESLEY L, KALHAN SC, CATALANO PM. Clinically useful estimates of insulin sensitivity during pregnancy: validation studies in women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* **24**(9): 1602-1607, 2001.
171. COHEN O, EPSTEIN GS, WEISZ B, HOMKO CJ, SIVAN E. Longitudinal assessment of insulin sensitivity in pregnancy. Validation of the homeostasis model assessment. *Clin Endocrinol (Oxf)* **64**(6): 640-644, 2006.
172. DIAMANTI-KANDARAKIS E, KOULI C, ALEXANDRAKI K, SPINA G. Failure of mathematical indices to accurately assess insulin resistance in lean, overweight, or obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(3): 1273-1276, 2004.
173. OTERDOOM LH, DE VRIES AP, VAN SON WJ, VAN DER HEIDE JJ, PLOEG RJ, GANSEVOORT RT, DE JONG PE, GANS RO, BAKKER SJ. Validation of insulin resistance indexes in a stable renal transplant population. *Diabetes Care* **28**(10): 2424-2429, 2005.
174. MAFFEI M, HALAAS J, RAVUSSIN E, PRATLEY RE, LEE GH, ZHANG Y, FEI H, KIM S, LALLONE R, RANGANATHAN S, . Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* **1**(11): 1155-1161, 1995.
175. VOHL MC, SLADEK R, ROBITAILLE J, GURD S, MARCEAU P, RICHARD D, HUDSON TJ, TCHERNOF A. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* **12**(8): 1217-1222, 2004.
176. CORBETTA S, BULFAMANTE G, CORTELAZZI D, BARRESI V, CETIN I, MANTOVANI G, BONDIONI S, BECK-PECCOZ P, SPADA A. Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(4): 2397-2402, 2005.
177. GOOD M, NEWELL FM, HAUPT LM, WHITEHEAD JP, HUTLEY LJ, PRINS JB. TNF and TNF receptor expression and insulin sensitivity in human omental and subcutaneous adipose tissue--influence of BMI and adipose distribution. *Diab Vasc Dis Res* **3**(1): 26-33, 2006.
178. FASSHAUER M, KLEIN J, LOSSNER U, PASCHKE R. Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* **35**(3): 147-152, 2003.
179. BRUUN JM, PEDERSEN SB, RICHELSEN B. Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(3): 1267-1273, 2001.
180. MOHAMED-ALI V, FLOWER L, SETHI J, HOTAMISLIGIL G, GRAY R, HUMPHRIES SE, YORK DA, PINKNEY J. beta-Adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(12): 5864-5869, 2001.

181. BRUUN JM, PEDERSEN SB, KRISTENSEN K, RICHELSEN B. Effects of pro-inflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue in vitro. *Mol Cell Endocrinol* **190**(1-2): 91-99, 2002.
182. KARAMOHAMED S, DEMISSIE S, VOLCJAK J, LIU C, HEARD-COSTA N, LIU J, SHOEMAKER CM, PANHUYSSEN CI, MEIGS JB, WILSON P, ATWOOD LD, CUPPLES LA, HERBERT A. Polymorphisms in the insulin-degrading enzyme gene are associated with type 2 diabetes in men from the NHLBI Framingham Heart Study. *Diabetes* **52**(6): 1562-1567, 2003.
183. GHOSH S, WATANABE RM, VALLE TT, HAUSER ER, MAGNUSON VL, LANGEFELD CD, ALLY DS, MOHLKE KL, SILANDER K, KOHTAMAKI K, CHINES P, BALOW JJ, BIRZNIEKS G, CHANG J, ELDRIDGE W, ERDOS MR, KARANJAWALA ZE, KNAPP JI, KUDELKO K, MARTIN C, MORALES-MENA A, MUSICK A, MUSICK T, PFAHL C, PORTER R, RAYMAN JB. The Finland-United States investigation of non-insulin-dependent diabetes mellitus genetics (FUSION) study. I. An autosomal genome scan for genes that predispose to type 2 diabetes. *Am J Hum Genet* **67**(5): 1174-1185, 2000.
184. FAKHRAI-RAD H, NIKOSHKOV A, KAMEL A, FERNSTROM M, ZIERATH JR, NORGREN S, LUTHMAN H, GALLI J. Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats. *Hum Mol Genet* **9**(14): 2149-2158, 2000.
185. FARRIS W, MANSOURIAN S, LEISSRING MA, ECKMAN EA, BERTRAM L, ECKMAN CB, TANZI RE, SELKOE DJ. Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am J Pathol* **164**(4): 1425-1434, 2004.
186. HWANG DY, SEO S, KIM Y, KIM C, SHIM S, JEE S, LEE S, SIN J, CHO J, KANG B, JANG I, CHO J. Significant change in insulin production, glucose tolerance and ER stress signaling in transgenic mice coexpressing insulin-siRNA and human IDE. *Int J Mol Med* **19**(1): 65-73, 2007.
187. WHITE MF. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* **182**(1-2): 3-11, 1998.
188. WHITE MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(3): E413-E422, 2002.
189. RENSTROM F, BUREN J, ERIKSSON JW. Insulin receptor substrates-1 and -2 are both depleted but via different mechanisms after down-regulation of glucose transport in rat adipocytes. *Endocrinology* **146**(7): 3044-3051, 2005.
190. FRAYN KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* **45**(9): 1201-1210, 2002.
191. ELIZALDE M, RYDEN M, VAN H, V, ENEROTH P, GYLLENHAMMAR H, HOLM C, RAMEL S, OLUND A, ARNER P, ANDERSSON K. Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res* **41**(8): 1244-1251, 2000.

192. AGUSTSSON T, RYDEN M, HOFFSTEDT J, VAN H, V, DICKER A, LAURENCIKIENE J, ISAKSSON B, PERMERT J, ARNER P. Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Res* **67**(11): 5531-5537, 2007.
193. BLUHER S, KRATZSCH J, KIESS W. Insulin-like growth factor I, growth hormone and insulin in white adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **19**(4): 577-587, 2005.
194. SIDDALS KW, WESTWOOD M, GIBSON JM, WHITE A. IGF-binding protein-1 inhibits IGF effects on adipocyte function: implications for insulin-like actions at the adipocyte. *J Endocrinol* **174**(2): 289-297, 2002.
195. POPOVICI RM, LU M, BHATIA S, FAESSEN GH, GIACCIA AJ, GIUDICE LC. Hypoxia regulates insulin-like growth factor-binding protein 1 in human fetal hepatocytes in primary culture: suggestive molecular mechanisms for in utero fetal growth restriction caused by uteroplacental insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(6): 2653-2659, 2001.
196. HEALD AH, SIDDALS KW, FRASER W, TAYLOR W, KAUSHAL K, MORRIS J, YOUNG RJ, WHITE A, GIBSON JM. Low circulating levels of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) are closely associated with the presence of macrovascular disease and hypertension in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**(8): 2629-2636, 2002.
197. QIU C, VADACHKORIA S, MERYMAN L, FREDERICK IO, WILLIAMS MA. Maternal plasma concentrations of IGF-1, IGFBP-1, and C-peptide in early pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* **193**(5): 1691-1697, 2005.
198. SCHLING P and LOFFLER G. Cross talk between adipose tissue cells: impact on pathophysiology. *News Physiol Sci* **17**:99-104.99-104, 2002.
199. BEN JONATHAN N, MERSHON JL, ALLEN DL, STEINMETZ RW. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* **17**(6): 639-669, 1996.
200. MCFARLAND-MANCINI M, HUGO E, LOFTUS J, BEN JONATHAN N. Induction of prolactin expression and release in human preadipocytes by cAMP activating ligands. *Biochem Biophys Res Commun* **344**(1): 9-16, 2006.
201. LABRIOLA L, FERREIRA GB, MONTOR WR, DEMASI MA, PIMENTA DC, LOJUDICE FH, GENZINI T, GOLDBERG AC, ELIASCHEWITZ FG, SOGAYAR MC. Prolactin-induced changes in protein expression in human pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol* **264**(1-2): 16-27, 2007.
202. LABRIOLA L, MONTOR WR, KROGH K, LOJUDICE FH, GENZINI T, GOLDBERG AC, ELIASCHEWITZ FG, SOGAYAR MC. Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* **263**(1-2): 120-133, 2007.
203. BARROS RP, MACHADO UF, GUSTAFSSON JA. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. *Trends Mol Med* **12**(9): 425-431, 2006.

204. GALLAGHER CJ, LANGEFELD CD, GORDON CJ, CAMPBELL JK, MYCHALECKYJ JC, BRYER-ASH M, RICH SS, BOWDEN DW, SALE MM. Association of the Estrogen Receptor Alpha gene with the Metabolic Syndrome and its component traits in African American families: The IRAS Family Study. *Diabetes* **56**(8):2135-2141, 2007.
205. DIXON A, WELLS CC, SINGH S, BABAYAN R, MARIC C. Renoprotective effects of a selective estrogen receptor modulator, raloxifene, in an animal model of diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* **27**(2): 120-128, 2007.
206. WELLS CC, RIAZI S, MANKHEY RW, BHATTI F, ECELBARGER C, MARIC C. Diabetic nephropathy is associated with decreased circulating estradiol levels and imbalance in the expression of renal estrogen receptors. *Gend Med* **2**(4): 227-237, 2005.

10 PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala svým školitelům, zejména Doc. MUDr. Martinu Haluzíkovi, CSc., duchovnímu otci celé tématu mé dizertační práce a kolegům z jeho laboratoře ze III. interní kliniky 1. LF UK a VFN za pomoc zejména při stanoveních sérových koncentrací adipokinů.

Nemalý dík patří také mým spolupracovníkům z Gynekologicko-porodnické kliniky 1. LF UK a VFN, zejména MUDr. Vratislavu Krejčímu, a také kolektivu sester z porodních sálů za výraznou pomoc při kolektování biologických vzorků.

Tato práce by nemohla vzniknout bez nesmírné vstřícnosti Ing. Drahomíry Springer z Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, která byla kdykoliv ochotna změřit cokoliv.

Naprostá většina mé laboratorní práce probíhala na Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK. Bez pochopení jeho přednosty Doc. MUDr. Bohuslava Matouše, CSc. a pomoci ostatních kolegů z tohoto ústavu především v mých laboratorních začátcích, by tato práce nikdy nevznikla. Ivance moc děkuju za sekvenace adipokinů, na jejichž výsledky již v této dizertaci nezbylo místo 😊.

Na závěr, avšak zcela jistě ne v poslední řadě, bych chtěla poděkovat celé své rodině za téměř nekonečnou trpělivost, podporu a pochopení.

Práce byla podpořena grantem IGA MZČR 8302-5 a Výzkumným záměrem MSM 0021620814

11 PŘÍLOHA 1: SEZNAM GENŮ ANALYZOVANÝCH POMOCÍ OLIGO GEARRAY HUMAN INSULIN SIGNALING PATHWAY MICROARRAY (OHS- 030; SUPERARRAY)

Position	GeneBank	Symbol	Description	GO Term
1	NM_002954	RPS27A	Ribosomal protein S27a	Intracellular; Protein biosynthesis; Structural constituent of ribosome; Ribosome;
2	NM_198834	ACACA	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	ATP binding; Ligase activity; Metabolism; Biotin carboxylase activity; Biotin carboxylase complex; Biotin binding; Fatty acid biosynthesis; Acetyl-CoA carboxylase activity;
3	NM_001093	ACACB	Acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	ATP binding; Ligase activity; Metabolism; Biotin carboxylase activity; Biotin carboxylase complex; Biotin binding; Fatty acid biosynthesis; Acetyl-CoA carboxylase activity;
4	NM_004035	ACOX1	Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	Oxidoreductase activity; Electron transport; Lipid metabolism; Peroxisome; Prostaglandin metabolism; Acyl-CoA oxidase activity; Fatty acid beta-oxidation; Electron donor activity;
5	NM_000025	ADRB3	Adrenergic, beta-3-, receptor	Plasma membrane; Signal transduction; Receptor activity; Integral to plasma membrane; Rhodopsin-like receptor activity; Energy reserve metabolism; G-protein signaling, coupled to cAMP nucleotide second messenger; Carbohydrate metabolism; Generation of precursor metabolites and energy; Beta3-adrenergic receptor activity;
6	NM_001129	AEBP1	AE binding protein 1	Cell adhesion; Proteolysis and peptidolysis; Cytoplasm; Transcription factor activity; Muscle development; Skeletal development; Carboxypeptidase activity; Carboxypeptidase A activity;
7	NM_001622	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	Extracellular space; Acute-phase response; Skeletal development; Regulation of inflammatory response; Positive regulation of phagocytosis; Kinase inhibitor activity; Cysteine protease inhibitor activity; Negative regulation of bone mineralization; Negative regulation of insulin receptor signaling pathway; Pinocytosis;
8	NM_005163	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Signal transduction; Nucleus; Anti-apoptosis; Receptor signaling protein serine/threonine kinase activity; G-protein coupled receptor protein signaling pathway; Nitric oxide biosynthesis; Response to heat;
9	NM_001626	AKT2	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Protein serine/threonine kinase activity;
10	NM_005465	AKT3	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Signal transduction; Protein serine/threonine kinase activity;
11	NM_001145	ANG	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	Endonuclease activity; Hydrolase activity; Nucleic acid binding; Cellular_component unknown; Pancreatic ribonuclease activity; mRNA cleavage;
12	NM_001654	ARAF	V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog	Receptor signaling protein activity; ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Diacylglycerol binding; Protein serine/threonine kinase activity; Cell growth and/or maintenance; Intracellular signaling cascade; Cellular_component unknown;
13	NM_138578	BCL2L1	BCL2-like 1	Integral to membrane; Apoptotic mitochondrial changes; Regulation of apoptosis; Negative regulation of survival gene product activity; Anti-apoptosis; Mitochondrial outer membrane; Mitochondrion;
14	NM_004333	BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	Receptor signaling protein activity; ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Diacylglycerol binding; Protein serine/threonine kinase activity; Cell growth and/or maintenance; Intracellular signaling cascade; Protein-tyrosine kinase activity; Anti-apoptosis; Organogenesis;
15	NM_006367	CAP1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	Signal transduction; Membrane; Establishment and/or maintenance of cell polarity; Adenylate cyclase activation;
16	NM_005188	CBL	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence	Calcium ion binding; Nucleus; Cell growth and/or maintenance; Transcription factor activity; Zinc ion binding; Ligase activity; Signal transducer activity; Ubiquitin-protein ligase activity; Cell surface receptor linked signal transduction; Protein ubiquitination; Ubiquitin ligase complex;
17	NM_004364	CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	DNA binding; RNA polymerase II transcription factor activity, enhancer binding; Regulation of transcription, DNA-dependent; Nucleus; Transcription; Generation of precursor metabolites and energy; Transcription from RNA polymerase II promoter;

18	NM_005194	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Regulation of transcription, DNA-dependent; Nucleus; Transcription factor activity; Inflammatory response; Transcription from Pol II promoter; Acute-phase response;
19	NM_005195	CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	DNA binding; Regulation of transcription, DNA-dependent; Nucleus; Transcription; Transcription from RNA polymerase II promoter;
20	NM_016823	CRK	V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)	Nucleus; Cytoplasm; Intracellular signaling cascade; Regulation of transcription from Pol II promoter; SH3/SH2 adaptor protein activity; Cell motility; Actin cytoskeleton organization and biogenesis;
21	NM_001891	CSN2	Casein beta	Calcium ion binding; Extracellular; Transporter activity; Transport; Calcium ion transport; Enzyme inhibitor activity;
22	NM_001928	CFD	Complement factor D (adipsin)	Hydrolase activity; Proteolysis and peptidolysis; Chymotrypsin activity; Trypsin activity; Complement activation, alternative pathway; Complement factor D activity;
23	NM_001381	DOK1	Docking protein 1, 62kDa (downstream of tyrosine kinase 1)	Protein binding; Cell surface receptor linked signal transduction; Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway; Insulin receptor binding;
24	NM_003974	DOK2	Docking protein 2, 56kDa	Protein binding; Cell surface receptor linked signal transduction; Insulin receptor binding;
25	NM_024872	DOK3	Docking protein 3	Insulin receptor binding;
26	NM_018110	DOK4	Docking protein 4	Kinase activity; Insulin receptor binding;
27	NM_018431	DOK5	Docking protein 5	Insulin receptor binding;
28	NM_152721	DOK6	Docking protein 6	Kinase activity; Insulin receptor binding;
29	NM_007026	DUSP14	Dual specificity phosphatase 14	Hydrolase activity; Protein amino acid dephosphorylation; Protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity;
30	NM_001414	EIF2B1	Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha, 26kDa	GTP binding; Guanyl-nucleotide exchange factor activity; Protein biosynthesis; Translation initiation factor activity; Translational initiation; Eukaryotic translation initiation factor 2B complex;
31	NM_001968	EIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E	Regulation of translation; Translation initiation factor activity; Translational initiation; RNA cap binding; Eukaryotic translation initiation factor 4F complex;
32	NM_004095	EIF4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	Regulation of translation; Negative regulation of protein biosynthesis; Eukaryotic translation initiation factor 4E binding; Negative regulation of translational initiation;
33	NM_001983	ERCC1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1	Endonuclease activity; Hydrolase activity; Nucleus; Damaged DNA binding; Nucleotide-excision repair; DNA repair; Morphogenesis; Endodeoxyribonuclease activity;
34	NM_004104	FASN	Fatty acid synthase	Transferase activity; Oxidoreductase activity; Zinc ion binding; Lyase activity; Biosynthesis; S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity; Fatty acid biosynthesis; [acyl-carrier protein] S-malonyltransferase activity; Alcohol dehydrogenase activity, zinc-dependent; Hydrolase activity, acting on ester bonds; Oleoyl-[acyl-carrier protein] hydrolase activity; Cofactor binding;
35	NM_000507	FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	Hydrolase activity; Carbohydrate metabolism; Fructose metabolism; Phosphoric ester hydrolase activity; Gluconeogenesis; Fructose-bisphosphatase activity; Fructose-2,6-bisphosphate 2-phosphatase activity;
36	NM_005252	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	DNA binding; Nucleus; Cell growth and/or maintenance; Inflammatory response; Specific RNA polymerase II transcription factor activity; DNA methylation; Regulation of transcription from Pol II promoter;
37	NM_004958	FRAP1	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	Transferase activity; Regulation of cell cycle; DNA recombination; DNA repair; Inositol or phosphatidylinositol kinase activity; Phosphoinositide 3-kinase complex;
38	NM_006654	FRS2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2	Signal transduction; Protein binding; Membrane fraction; G-protein coupled receptor protein signaling pathway; Receptor activity; Integral to plasma membrane; Transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway; Fibroblast growth factor receptor signaling pathway; Insulin receptor binding; Regulator of G-protein signaling activity; Transmembrane receptor protein tyrosine kinase adaptor protein activity; Phosphatase activator activity;
39	NM_006653	FRS3	Fibroblast growth factor receptor substrate 3	Signal transduction; Receptor activity; Fibroblast growth factor receptor signaling pathway; Insulin receptor binding;
40	NM_000151	G6PC	Glucose-6-phosphatase, catalytic subunit	Hydrolase activity; Integral to membrane; Glucose metabolism; Endoplasmic reticulum; Microsome; Transporter activity; Transport; Glucose-6-phosphatase activity; Sugar porter activity; Glycogen biosynthesis; Glycogen metabolism;
41	NM_000402	G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Cellular component unknown; Oxidoreductase activity; Glucose metabolism; Carbohydrate metabolism; Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase activity; Glucose 6-phosphate utilization; Pentose-phosphate shunt;
42	NM_002039	GAB1	GRB2-associated binding protein 1	Cell proliferation; Protein binding; Epidermal growth factor receptor signaling pathway; Insulin receptor signaling pathway; SH3/SH2 adaptor activity;

43	NM_002054	GCG	Glucagon	Cell proliferation; Signal transduction; G-protein coupled receptor protein signaling pathway; Soluble fraction; Hormone activity; Feeding behavior; Extracellular region;
44	NM_000162	GCK	Glucokinase (hexokinase 4, maturity onset diabetes of the young 2)	ATP binding; Transferase activity; Glycolysis; Kinase activity; Glucokinase activity; Hexokinase activity;
45	NM_005276	GPD1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	Cytoplasm; Carbohydrate metabolism; Glycerol-3-phosphate dehydrogenase complex; Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) activity; NAD binding; Glycerol-3-phosphate catabolism;
46	NM_000408	GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	Calcium ion binding; Oxidoreductase activity; Mitochondrion; Electron transport; Glycerol-3-phosphate metabolism; Glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity; Glycerol-3-phosphate dehydrogenase complex; Glucose catabolism;
47	NM_005311	GRB10	Growth factor receptor-bound protein 10	Plasma membrane; Cytoplasm; Intracellular signaling cascade; Cell-cell signaling; Insulin receptor signaling pathway; SH3/SH2 adaptor activity;
48	NM_002086	GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	Intracellular signaling cascade; SH3/SH2 adaptor protein activity; Epidermal growth factor receptor signaling pathway; RAS protein signal transduction; Cell-cell signaling; Epidermal growth factor receptor binding;
49	NM_019884	GSK3A	Glycogen synthase kinase 3 alpha	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Protein serine/threonine kinase activity;
50	NM_002093	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Wnt receptor signaling pathway; Glycogen metabolism; Glycogen synthase kinase 3 activity;
51	NM_000189	HK2	Hexokinase 2	ATP binding; Transferase activity; Regulation of cell cycle; Mitochondrial outer membrane; Membrane; Glycolysis; Kinase activity; Hexokinase activity;
52	NM_005343	HRAS	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	GTP binding; GTPase activity; Small GTPase mediated signal transduction; Plasma membrane; Cytoplasm; Cell growth and/or maintenance; Regulation of cell cycle; Cell surface receptor linked signal transduction; Organogenesis; Cell motility; Chemotaxis;
53	NM_000875	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Integral to membrane; Signal transduction; Protein binding; Anti-apoptosis; Regulation of cell cycle; Positive regulation of cell proliferation; Receptor activity; Epidermal growth factor receptor activity; Insulin-like growth factor receptor activity; Insulin receptor signaling pathway;
54	NM_000612	IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	Cell proliferation; Regulation of cell cycle; Development; Growth factor activity; Hormone activity; Insulin-like growth factor receptor binding; Prothoracicotrophic hormone activity; Physiological process; Skeletal development; Insulin receptor signaling pathway; Imprinting; Extracellular region;
55	NM_000596	IGFBP1	Insulin-like growth factor binding protein 1	Regulation of cell growth; Signal transduction; Extracellular space; Insulin-like growth factor binding;
56	NM_000207	INS	Insulin	Cell surface receptor linked signal transduction; Glucose metabolism; Hormone activity; Physiological process; Cell-cell signaling; Lipid metabolism; Insulin receptor binding; Extracellular region; Generation of precursor metabolites and energy;
57	NM_005543	INSL3	Insulin-like 3 (Leydig cell)	Soluble fraction; Hormone activity; Physiological process; Cell-cell signaling; Spermatogenesis; Insulin receptor binding; Extracellular region;
58	NM_000208	INSR	Insulin receptor	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Signal transduction; Development; Receptor activity; Integral to plasma membrane; Epidermal growth factor receptor activity; Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway; Receptor signaling protein tyrosine kinase activity; Carbohydrate metabolism; Generation of precursor metabolites and energy; Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling protein activity;
59	NM_005544	IRS1	Insulin receptor substrate 1	Signal transduction; Protein binding; Cytoplasm; Signal transducer activity; Insulin receptor binding; Transmembrane receptor protein tyrosine kinase docking protein activity;
60	NM_003749	IRS2	Insulin receptor substrate 2	Signal transduction; Positive regulation of cell proliferation; Signal transducer activity; Receptor activity; Glucose metabolism; Insulin receptor binding;
61	NM_003604	IRS4	Insulin receptor substrate 4	Plasma membrane; Signal transduction; Receptor activity; Insulin receptor binding; SH3/SH2 adaptor activity;
62	NM_002228	JUN	Jun oncogene	Regulation of transcription, DNA-dependent; Cell growth and/or maintenance; Transcription factor activity; RNA polymerase II transcription factor activity; Nuclear chromosome;
63	NM_005655	KLF10	Kruppel-like factor 10	Cell proliferation; Regulation of transcription, DNA-dependent; Nucleus; Negative regulation of cell proliferation; Transcription factor activity; Zinc ion binding; Skeletal development; Cell-cell signaling; Transforming growth factor beta receptor signaling pathway; Transcription; Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter;
64	NM_004985	KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	GTP binding; GTPase activity; Small GTPase mediated signal transduction; Cell growth and/or maintenance; Regulation of cell cycle;

			oncogene homolog	
65	NM_000527	LDLR	Low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	Calcium ion binding; Integral to plasma membrane; Transmembrane receptor activity; Lipid metabolism; Cholesterol metabolism; Endocytosis; Lipid transporter activity; Lipid transport; Low-density lipoprotein receptor activity; Lipoprotein binding; Coated pit; O-linked glycosylation;
66	NM_000230	LEP	Leptin (obesity homolog, mouse)	Signal transduction; Extracellular space; Hormone activity; Cell-cell signaling; Energy reserve metabolism;
67	NM_002755	MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Signal transduction; Protein serine/threonine kinase activity; Protein-tyrosine kinase activity; Cell motility; Chemotaxis; MAP kinase activity;
68	NM_030662	MAP2K2	Mitogen-activated protein kinase kinase 2	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Extracellular; Protein serine/threonine kinase activity; Protein-tyrosine kinase activity;
69	NM_002745	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Signal transduction; Protein serine/threonine kinase activity; Protein-tyrosine kinase activity; Induction of apoptosis; MAP kinase activity; Cell cycle; Response to stress; Chemotaxis; Synaptic transmission;
70	NM_003684	MKNK1	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Protein kinase cascade; Signal transduction; Protein serine/threonine kinase activity; Protein-tyrosine kinase activity; Regulation of translation; Response to stress;
71	NM_006153	NCK1	NCK adaptor protein 1	Receptor binding; Cytoplasm; Intracellular signaling cascade; Signal complex formation; T-cell activation; Receptor signaling complex scaffold activity; Positive regulation of T-cell proliferation; Positive regulation of actin filament polymerization; Cytoskeletal adaptor activity;
72	NM_003581	NCK2	NCK adaptor protein 2	Protein binding; Cytoplasm; Intracellular signaling cascade; Negative regulation of cell proliferation; Signal complex formation; T-cell activation; Receptor signaling complex scaffold activity; Positive regulation of T-cell proliferation; Positive regulation of actin filament polymerization; Regulation of epidermal growth factor receptor activity; Cytoskeletal adaptor activity;
73	NM_000625	NOS2A	Nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)	Calcium ion binding; Electron transporter activity; Oxidoreductase activity; Inflammatory response; Cytosol; Nitric oxide biosynthesis; Electron transport; Superoxide metabolism; Calmodulin binding; Nitric-oxide synthase activity; Defense response to bacteria; Heme binding; FMN binding; Positive regulation of cytotoxic T-cell differentiation;
74	NM_000905	NPY	Neuropeptide Y	Cell proliferation; Cell motility; G-protein signaling, coupled to cyclic nucleotide second messenger; Circulation; G-protein coupled receptor activity; Calcium ion transport; Feeding behavior; Cell; Neuropeptide signaling pathway; Synaptic transmission; Neuropeptide hormone activity; Digestion; Calcium channel regulator activity; Extracellular region;
75	NM_004563	PCK2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	GTP binding; Mitochondrion; Lyase activity; Manganese ion binding; Gluconeogenesis; Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) activity;
76	NM_002613	PDPK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	Plasma membrane; ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Cytoplasm; Protein-tyrosine kinase activity; Insulin receptor signaling pathway; Actin cytoskeleton organization and biogenesis; 3-phosphoinositide-dependent protein kinase activity;
77	NM_017934	PHIP	Pleckstrin homology domain interacting protein	DNA binding; Regulation of transcription, DNA-dependent; Nucleus; Protein binding; Cell cycle; Insulin receptor signaling pathway; Insulin receptor binding;
78	NM_006218	PIK3CA	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	Transferase activity; Signal transduction; Inositol or phosphatidylinositol kinase activity; Phosphatidylinositol 3-kinase activity; Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase activity; Phosphoinositide 3-kinase complex;
79	NM_006219	PIK3CB	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	Transferase activity; Signal transduction; Regulation of cell cycle; G-protein coupled receptor protein signaling pathway; Chemotaxis; Inositol or phosphatidylinositol kinase activity; Phosphatidylinositol 3-kinase activity; Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase activity; Activation of MAPK; Phosphoinositide 3-kinase complex;
80	NM_181504	PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)	Intracellular signaling cascade; Kinase activity; Phosphatidylinositol 3-kinase activity; Phosphoinositide 3-kinase complex; Phosphatidylinositol binding;
81	NM_005027	PIK3R2	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (p85 beta)	Intracellular signaling cascade; Insulin receptor signaling pathway; Phosphoinositide 3-kinase complex; Regulation of phosphorylation; Contributes to phosphatidylinositol 3-kinase activity; Negative regulation of anti-apoptosis;
82	NM_003629	PIK3R3	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (p55, gamma)	Intracellular signaling cascade; Kinase activity; Insulin receptor signaling pathway; Phosphatidylinositol 3-kinase activity; Phosphoinositide 3-kinase complex;
83	NM_000298	PKLR	Pyruvate kinase, liver and RBC	Glycolysis; Magnesium ion binding; Pyruvate kinase activity;
84	NM_002654	PKM2	Pyruvate kinase, muscle	Transferase activity; Cytosol; Glycolysis; Magnesium ion binding; Pyruvate kinase activity;

85	NM_015869	PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Energy pathways; Response to nutrients; Signal transduction; Nucleus; Transcription factor activity; Regulation of transcription from Pol II promoter; Steroid hormone receptor activity; Lipid metabolism; White adipocyte differentiation;
86	NM_002708	PPP1CA	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform	Hydrolase activity; Cell cycle; Carbohydrate metabolism; Glycogen metabolism; Phosphoprotein phosphatase activity; Cytokinesis; Manganese ion binding;
87	NM_002738	PRKCB1	Protein kinase C, beta 1	Plasma membrane; ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Calcium ion binding; Cytoplasm; Diacylglycerol binding; Intracellular signaling cascade; Protein kinase C activity;
88	NM_002739	PRKCG	Protein kinase C, gamma	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Calcium ion binding; Diacylglycerol binding; Intracellular signaling cascade; Protein kinase C activity;
89	NM_002740	PRKCI	Protein kinase C, iota	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Nucleus; Diacylglycerol binding; Protein serine/threonine kinase activity; Intracellular signaling cascade; Cytosol; Cytoskeleton organization and biogenesis; Vesicle-mediated transport; Phospholipid binding; Atypical protein kinase C activity; Secretion; Intercellular junction assembly and/or maintenance; Establishment and/or maintenance of epithelial cell polarity; Membrane organization and biogenesis; Protein-membrane targeting; Polarosome;
90	NM_002744	PRK CZ	Protein kinase C, zeta	Plasma membrane; ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Cytoplasm; Diacylglycerol binding; Protein serine/threonine kinase activity; Intracellular signaling cascade; Anti-apoptosis; Membrane fraction; Atypical protein kinase C activity;
91	NM_000948	PRL	Prolactin	Cell proliferation; Cell surface receptor linked signal transduction; Extracellular space; Soluble fraction; Hormone activity; Pregnancy; Hemocyte development; Lactation; Prolactin receptor binding;
92	NM_002827	PTPN1	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	Hydrolase activity; Signal transduction; Cytoplasm; Soluble fraction; Protein amino acid dephosphorylation; Protein tyrosine phosphatase activity;
93	NM_002834	PTPN11	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (Noonan syndrome 1)	Hydrolase activity; Protein binding; Intracellular signaling cascade; Perception of sound; Protein amino acid dephosphorylation; Non-membrane spanning protein tyrosine phosphatase activity;
94	NM_002840	PTPRF	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	Hydrolase activity; Cell adhesion; DNA binding; Nucleus; Protein binding; Receptor activity; Integral to plasma membrane; Transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway; Protein amino acid dephosphorylation; Protein tyrosine phosphatase activity; Transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase activity;
95	NM_002880	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	Receptor signaling protein activity; ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Cell proliferation; Protein binding; Diacylglycerol binding; Protein serine/threonine kinase activity; Intracellular signaling cascade; Apoptosis; Mitochondrial outer membrane;
96	NM_020415	RETN	Resistin	Hormone activity; Biological_process unknown; Extracellular region;
97	NM_002953	RPS6KA1	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Signal transduction; Protein serine/threonine kinase activity; Protein-tyrosine kinase activity;
98	NM_003161	RPS6KB1	Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1	ATP binding; Transferase activity; Protein amino acid phosphorylation; Signal transduction; Protein serine/threonine kinase activity;
99	NM_006270	RRAS	Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	GTP binding; GTPase activity; RAS protein signal transduction;
100	NM_012250	RRAS2	Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	GTP binding; Small GTPase mediated signal transduction; Intracellular protein transport;
101	NM_000602	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	Extracellular; Blood coagulation; Serine-type endopeptidase inhibitor activity; Plasminogen activator activity;
102	NM_003029	SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	Plasma membrane; Regulation of cell growth; Intracellular signaling cascade; Positive regulation of cell proliferation; Activation of MAPK; Phospholipid binding; Transmembrane receptor protein tyrosine kinase adaptor protein activity; Positive regulation of mitosis; Regulation of epidermal growth factor receptor activity;
103	NM_016848	SHC3	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3	Intracellular signaling cascade; Cellular_component unknown; Signal transducer activity; Epidermal growth factor receptor signaling pathway; Central nervous system development;
104	NM_005094	SLC27A4	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4	Ligase activity; Metabolism; Lipid metabolism; Lipid transport; Catalytic activity; Fatty acid transporter activity; Fatty acid transport;

105	NM_006516	SLC2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	Integral to membrane; Membrane fraction; Transporter activity; Glucose transporter activity; Glucose transport; Sugar porter activity; Carbohydrate transport;
106	NM_001042	SLC2A4	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	Membrane fraction; Membrane; Integral to plasma membrane; Transporter activity; Glucose transporter activity; Glucose transport; Carbohydrate metabolism; Sugar porter activity; Carbohydrate transport;
107	NM_006434	SORBS1	Sorbin and SH3 domain containing 1	Nucleus; Membrane; Insulin receptor signaling pathway; Transport; Glucose transport; Actin binding; Lipid raft; Insulin receptor binding; Stress fiber; Zonula adherens; Stress fiber formation; Focal adhesion formation; Cell-substrate adherens junction;
108	NM_005633	SOS1	Son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	DNA binding; RAS protein signal transduction; Ras guanyl-nucleotide exchange factor activity; Rho GTPase activator activity; Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity;
109	NM_006939	SOS2	Son of sevenless homolog 2 (Drosophila)	Small GTPase mediated signal transduction; DNA binding; Cellular_component unknown; Guanyl-nucleotide exchange factor activity;
110	NM_004176	SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	Golgi apparatus; Integral to membrane; Transcription factor activity; RNA polymerase II transcription factor activity; Lipid metabolism; Cholesterol metabolism; Transcription; Endoplasmic reticulum membrane; Steroid metabolism; Nuclear membrane; Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter;
111	NM_003235	TG	Thyroglobulin	Signal transduction; Hormone activity; Extracellular region; Thyroid hormone generation;
112	NM_021833	UCP1	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	Integral to membrane; Mitochondrion; Membrane fraction; Transporter activity; Transport; Binding; Mitochondrial transport; Mitochondrial inner membrane; Proton transport; Generation of precursor metabolites and energy;
113	NM_003355	UCP2	Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	Integral to membrane; Mitochondrion; Membrane fraction; Transporter activity; Transport; Binding; Mitochondrial transport; Mitochondrial inner membrane; Proton transport;
114	NM_003376	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Cell proliferation; Signal transduction; Extracellular; Regulation of cell cycle; Positive regulation of cell proliferation; Homophilic cell adhesion; Membrane; Soluble fraction; Heparin binding; Growth factor activity; Response to stress; Vascular endothelial growth factor receptor binding; Angiogenesis;
115	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	
116	BLANK			
117	BLANK			
118	SA_00005	AS1R2	Artificial Sequence 1 Related 2 (80% identity)(48/60)	
119	SA_00004	AS1R1	Artificial Sequence 1 Related 1 (90% identity)(54/60)	
120	SA_00003	AS1	Artificial Sequence 1	
121	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Cytoplasm; Oxidoreductase activity; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) activity; Glucose metabolism; Glycolysis;
122	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	Extracellular; Immune response;
123-4	NM_007355	HSP90A B1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	ATP binding; Protein binding; Cytoplasm; Heat shock protein activity; Protein folding; TPR domain binding; Nitric-oxide synthase regulator activity; Positive regulation of nitric oxide biosynthesis; Unfolded protein binding; Response to unfolded protein; ATP binding; Protein binding; Cytoplasm; Heat shock protein activity; Protein folding; TPR domain binding; Nitric-oxide synthase regulator activity; Positive regulation of nitric oxide biosynthesis; Unfolded protein binding; Response to unfolded protein;
125-6	NM_001101	ACTB	Actin, beta	
127-8	SA_00007	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence	

Pozn: Šedě jsou označeny HK geny a kontrolní spoty. Číslování pozic je z levého horního rohu (viz Obr. 19).