

**Přírodovědecká fakulta University Karlovy
Katedra Antropologie a genetiky člověka**

ENERGETICKÝ METABOLISMUS

**VYBRANÉ GENETICKÉ A HORMONÁLNÍ FAKTORY
ÚČASTNÍCÍ SE JEHO REGULACE**

Dizertační práce

Praha 2007

RNDr. Daniela Vejražková,
roz. Šrámková

Předkládaná dizertační práce završuje postgraduální studium na Přírodovědecké fakultě University Karlovy, obor Antropologie a genetika člověka. Byla vypracována v Endokrinologickém ústavu v Praze, v letech 1999-2007, pod vedením externí školitelky RNDr. Běly Bendlové, CSc..

Dizertační práce vznikala v rámci grantových projektů: IGA MZ ČR NB/5395-5, IGA MZ ČR NB/7391-3, IGA MZ ČR NR/7809-5, COST OC.B17.10, GA ČR 301/04/1085.

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Dále prohlašuji, že jsem tuto práci ani její podstatnou část nepoužila pro získání jiného ani stejného akademického titulu.

PODĚKOVÁNÍ

Studiu energetického metabolismu a především jeho genetického a hormonálního pozadí jsem se mohla věnovat v Endokrinologickém ústavu v Praze. Výzkumné skupiny se zde věnují již více než deset let hledání genetických příčin diabetu 2. typu a zkoumá se zde také genetická a hormonální podmíněnost obezity a syndromu polycystických ovarií. Tyto tři klinické jednotky jsou vzájemně velmi úzce provázané, jsou v přímé souvislosti s tzv. metabolickým syndromem a právě jimi se zabývám v předkládané dizertační práci. V rámci řešení grantových projektů Endokrinologického ústavu bylo možno zavést řadu molekulárně genetických metodik a podařilo se shromáždit rozsáhlé a podrobně charakterizované soubory diabetiků 2. typu, potomků diabetiků, obézních jedinců a pacientek se syndromem polycystických ovarií, jakož i kvalitní soubor zdravých kontrolních jedinců.

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat všem svým kolegům, kteří mi vycházeli vstříc a zasloužili se o dokončení práce.

Především děkuji své odborné školitelce, paní doktorce RNDr. Běle Bendlové, CSc., za její přátelské a trpělivé vedení, za její nesmírnou ochotu a optimismus, s nímž mi pomáhala řešit drobné i větší potíže. MUDr. Janě Vrbíkové, Ph.D., moc děkuji za velikou pomoc při přípravě podkladů pro tuto dizertační práci a za odborný dozor při vyšetřování pacientek se syndromem polycystických ovarií clampovou technikou. Můj velký dík patří také doc. RNDr. Pavlu Bláhovi, CSc., z katedry Antropologie a genetiky člověka PŘF UK, který mi v průběhu celé výzkumné činnosti laskavě umožňoval zpracovávat antropometrická data programem ANTROPO. Díky tomu jsou vyšetřovaní jedinci velice dobře charakterizováni, pokud jde o složení těla a procento podkožního tuku. Ráda bych poděkovala i všem pracovníkům dětské léčebny Dr. L. Filipa v Poděbradech za vstřícnou spolupráci. Velice děkuji doc. MUDr. Karlu Vondrovi, DrSc., jehož laboratoří Funkčních testů účastníci výzkumu procházeli, za odborné posuzování jejich zdravotního stavu. Děkuji MUDr. Haně Kvasničkové, MUDr. Kateřině Dvořákové a MUDr. Soně Stanické, Ph.D., za pečlivý lékařský dozor. Sestrám Janě Novotné a Romaně Bajtlové děkuji za šetrné odběry a za milou atmosféru, kterou dovedly kolem sebe vytvořit. Doc. MUDr. Marii Kunešové, CSc., a Doc. MUDr. Vojtěchu Hainerovi, CSc., z Endokrinologického ústavu bych ráda poděkovala za poskytnutí klinicko-biochemických údajů souboru obézních jedinců a Prof. MUDr. Terezii Pelikánové, DrSc., z Diabetologického centra IKEM patří mé poděkování za pomoc s kompletací souboru pacientů s diabetes mellitus 2. typu.

Můj velký dík bych ráda vyjádřila také svým nejbližším kolegům, RNDr. Markétě Vaňkové, Ph.D., Mgr. Petře Lukášové a Mgr. Josefu Včelákovi, kteří pomáhali zajišťovat organizaci sběru dat a mají významný podíl též na jejich ukládání do počítačové databáze. Laborantkám Heleně Vrátné, Haně Opltové a Aleně Tošnarové děkuji za provedení stovek klinicko-biochemických stanovení a izolaci DNA geneticky testovaných jedinců.

Při svém děkování nechci zapomenout na další laboranty a odborné pracovníky Endokrinologického ústavu, jejichž rukama testované vzorky prošly.

V neposlední řadě moc děkuji všem dobrovolníkům, kteří si v dnešní uspěchané době udělali čas a zúčastnili se diabetologických a obezitologických studií. Přispěli tak k vědeckému poznávání složitého a závažného tématu, jakým regulace energetického metabolismu je, zejména v souvislosti s tak rozšířenými onemocněními, jakými jsou metabolický syndrom, diabetes mellitus 2. typu a obezita.

OBSAH

	strana
Seznam použitých zkratk.....	7
1. Úvod do problematiky.....	10
1.1 Centrální regulace energetického metabolismu	12
1.2 AMP aktivovaná proteinová kináza – energetický senzor buňky.....	13
1.3. Teorie úsporného genotypu a fenotypu.....	14
1.4. Diabetes mellitus 2. typu.....	15
1.5. Metabolický syndrom, obezita a adipokiny.....	18
1.6. Neurocentrický model.....	21
1.7. Syndrom polycystických ovarií.....	22
1.8. Studované kandidátní geny.....	24
1.8.1. Gen <i>PPARGgamma2</i>	24
1.8.2. Gen <i>UCPI</i>	25
1.8.3. Gen <i>KCNJ11</i>	26
2. Cíl a koncepce.....	28
3. Klinická a metodická část.....	29
3.1. Studované soubory.....	29
3.2. Charakterizace souborů.....	29
3.2.1. Vyšetřovací metody.....	30
3.2.2. Sledované klinicko-biochemické parametry.....	31
3.3. Metody DNA analýzy.....	34
3.3.1. Izolace DNA	34
3.3.2. PCR amplifikace	35
3.3.3. RFLP analýza	37
3.3.4. SSCP analýza	38
3.4. Zpracování dat	39
3.4.1. Databáze Access.....	39

3.4.2.	Statistické metody.....	39
4.	Dodatek k přiloženým publikacím.....	40
4.1.	Mutace Pro113Gln genu <i>PPARGgamma2</i>	40
4.2.	Polymorfismus E23K genu <i>KCNJ11</i>	40
5.	Souhrn.....	42
6.	Publikace komentované v dizertační práci	44
7.	Prezentace výsledků na vědeckých symposiích.....	45
8.	Literatura.....	51

SEZNAM ZKRATEK

A-3826G substituce adeninu za guanin v promotorové oblasti, v pozici -3826

ADP adenosindifosfát

AgRP agouti related protein

AMP adenosinmonofosfát

AMPK AMP-aktivovaná proteinová kináza

AntiGAD protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové

AntiIA2 protilátky proti tyrozin fosfatáze

ATP adenzin trifosfát

AUC area under curve, plocha pod křivkou grafu

BMI body mass index, podíl tělesné hmotnosti (kg) a druhé mocniny výšky (m²)

CNS centrální nervová soustava

CYP17 Cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/17, 20-lyase

DHEA dehydroepiandrosteron

DHEA-S dehydroepiandrosteronsulfát

DI dispoziční index

DM diabetes mellitus

DM2 diabetes mellitus 2. typu

DNA deoxyribonukleová kyselina

dNTP deoxyribonukleotidtrifosfát

E23K substituce aminokyseliny glutaminu za lysin na 23. pozici

EDTA ethylene diamine tetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraacetová

EKG elektrokardiografické vyšetření

ESHRE European Society of Human Reproduction and Embryology

FGIR fasting glucose to insulin ratio, poměr glukózy ku inzulínu nalačno

FIRI fasting insulin resistance index, index inzulínové rezistence získaný z lačných hodnot

HDL high density lipoprotein, lipoprotein s vysokou hustotou

HOMA-F homeostatický model funkce beta-buněk pankreatu

HOMA-R homeostatický model inzulínové rezistence

HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IGF insulin-like growth factor, růstový faktor podobný inzulínu

IRS-PI3K inzulínový receptorový substrát–fosfatidylinositol 3`OH kináza

ITT inzulínový toleranční test

KCNJ Potassium channel inwardly rectifying, rodina genů kódujících draselné kanály

Kir Potassium channel inwardly rectifying, protein kódovaný genem KCNJ

LDL low density lipoprotein, lipoprotein s nízkou hustotou

MIDD maternally-inherited diabetes and deafness, maternálně děděný diabetes a hluchota

mRNA mediátorová ribonukleová kyselina

NIDDM non-inzulin dependentní diabetes mellitus, synonymum pro DM2

NPY neuropeptid Y

OGTT orální glukózový toleranční test

PCOS polycystic ovary syndrom, syndrom polycystických ovarií

PCR polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

POMC proopiomelanokortin

PPARs peroxisome proliferator-activated receptors, rodina genů kódujících nukleární receptory

Pro12Ala substituce aminokyseliny prolinu za alanin ve 12. kodónu

Pro113Gln substituce aminokyseliny prolinu za glutamin ve 113. kodónu

RFLP restriction fragment length polymorphism, polymorfismus délky restrikčních fragmentů

RIA radioimmunoassay, radioimunoanalýza

SHBG sex hormon binding globulin, globulin vázající pohlavní hormony

SNP single nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus

SSCP single strand conformational polymorphism, metoda DNA analýzy

SUR sulfonylureový receptor

T3 trijodtyronin

T4 tyroxin

TE pufr Tris-HCl 10 mmol* l^{-1} , EDTA 1 mmol* l^{-1}

TSH tyreotropní hormon

UCPs uncoupling proteins, rodina rozpřahovacích proteinů

VMK volné mastné kyseliny

WHR waist to hip ratio, poměr obvodu pasu a boků

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Energetický metabolismus představuje nesmírně složitou a dynamickou soustavu enzymy katalyzovaných biochemických procesů, které se řídí materiálovými a energetickými potřebami organismu. Během těchto procesů se v živinách přijatá energie podle momentálních potřeb organismu zčásti spotřebuje, zčásti je v anabolických reakcích využita na výstavbu buněčných struktur, část je v podobě tepelné energie uvolněna. Energetické přebytky se ve formě tuků či glykogenu ukládají v zásobních tkáních. Metabolické dráhy jsou vzájemně propojeny, takže konečný produkt jedné reakce je substrátem další, navíc mnohé dráhy navazují i na meziprodukty jiných metabolických drah. Regulace těchto dějů je podmíněna neurohumorálně za účasti mnoha hormonů a mediátorů. Celý systém metabolických drah je ve své komplexnosti obsažen v genetickém kódu a jeho prostřednictvím je předáván z generace na generaci.

Poruchy energetického metabolismu stojí v pozadí závažných civilizačních chorob – obezity, diabetes mellitus 2. typu (DM2) a tzv. metabolického syndromu, jejichž prevalence v posledních letech rapidně vzrůstá. Jsou spojeny se zvýšenou morbiditou a mortalitou a představují závažný zdravotnický a socioekonomický problém.

Publikace, které jsem zařadila do své dizertační práce, jsou zaměřené jednak na vytipované, tzv. kandidátní geny, o nichž se předpokládá, že se jejich produkty na řízení energetického metabolismu významně podílejí, a jednak pojednávají o hormonech zapojených do glykoregulace a ovlivňujících hospodaření s energií.

Dva ze studovaných kandidátních genů, o nichž pojednávají zařazené genetické studie (gen *PPARGgamma2* a *KCNJ11*), se podílejí na sekreci či účinku jednoho z hlavních anabolických hormonů-inzulínu. Bezprostředně tak souvisejí s onemocněním diabetes mellitus a v souvislosti s ním jsou také nejčastěji zkoumány. Vzhledem ke komplexnímu působení inzulínu v organismu jsou tyto geny studovány též v souvislosti s obezitou a metabolickým syndromem. Přímý vztah k obezitě má třetí kandidátní gen (*UCP1*), jemuž je věnována jedna publikovaná genetická studie. V dalších publikacích se soustředím na vybrané hormony produkované především tukovou tkání, konkrétně jde o leptin, rezistin a adiponektin. Zmíněn je též žaludeční hormon ghrelin. Tyto hormony jsou studované především ve vztahu k obezitě, neboť se uplatňují při regulaci chuti k jídlu. V předkládané práci jsou uvedeny také v souvislosti se syndromem polycystických ovarií, což je onemocnění, u něž hraje obezita a zejména distribuce podkožního tuku významnou roli.

Kandidátní geny a hormony tukové tkáně jsou v přiložených publikacích studovány vždy ve vztahu ke konkrétním metabolickým poruchám, jimiž jsou diabetes mellitus 2. typu, obezita, metabolický syndrom a syndrom polycystických ovarií. Úvodní kapitoly jsou proto věnovány základní charakteristice každé z těchto klinických jednotek.

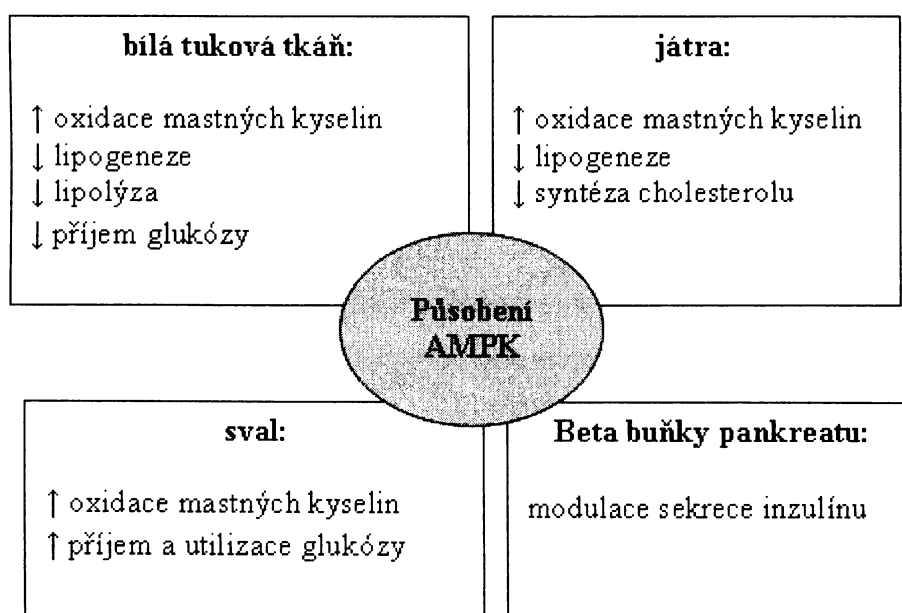
1.1. Centrální regulace energetického metabolismu

Již v polovině 19. století poukazoval uznávaný fyziolog Claude Bernard na důležitou roli mozku v glukózovém metabolismu. Po objevu inzulínu v roce 1923 však byla otázka úlohy centrálního nervového systému (CNS) v regulaci glukózové homeostázy na dlouhou dobu opomíjena. Nedávné důkazy ovšem potvrzují, že mozek hraje klíčovou roli jak v regulaci metabolismu glukózy, tak v regulaci metabolismu tuků. Nervový systém získává informaci o energetických zásobách a o momentální dostupnosti energie prostřednictvím hormonálních signálů (leptin, inzulín a další) a prostřednictvím signálů nutričních (zejména koncentrace glukózy a volných mastných kyselin v krvi). Na základě těchto informací pak reguluje energetický příjem, výdej i endogenní produkci glukózy a u zdravých jedinců tak udržuje hladinu glykémie v normálním rozmezí (Seeley, Woods 2003).

Mozková tkáň je pokládána za tkáň nezávislou na působení inzulínu a dlouhou dobu byla proto považována i za tkáň na působení inzulínu necitlivou. Vycházelo se z poznatku, že inzulín není v mozku hlavním regulátorem využití glukózy a také z předpokladu, že molekula inzulínu pro svou velikost nemůže volně procházet přes hematoencefalickou bariéru. Novější pozorování však prokázala, že mozek, i když je při využívání glukózy na inzulínu nezávislý, není vůči tomuto hormonu necitlivý. První důkazy o působení inzulínu v mozku jsou staré více než 25 let, kdy bylo zjištěno u primátů, že jejich příjem potravy se snížil, pokud jim byly kontinuální intracerebroventrikulární infúzí podávány nízké dávky inzulínu (Woods et al. 1979). Postupně přibýly důkazy o tom, že hladiny cirkulujícího inzulínu odrážejí množství tukové tkáně, dále že cirkulující inzulín je transportován do mozku a mozková tkáň že obsahuje pro tento hormon receptory koncentrované v oblastech podílejících se na autonomních funkcích a také na kontrole příjmu potravy, zejména v nucleus arcuatus (Schwartz et al. 1992). Inzulín se tak stal kandidátním signálem tzv. adipocytární negativní zpětné vazby v centrální kontrole energetické homeostázy. Později se prokázalo, že intracerebroventrikulární infúze inzulínu vede i ke snížení jaterní produkce glukózy zvýšením senzitivity hepatocytů vůči inzulínu (Obici et al. 2002) a inzulín tak začal být považován za centrální regulátor nejen energetické rovnováhy, ale i glukózové homeostázy. Tyto závěry jsou potvrzovány zvířecími modely (Okamoto et al. 2004). Stejně jako v periferních tkáních, i v mozku je přenos inzulínového signálu realizován přes inzulínový receptorový substrát-fosfatidylinositol 3`OH kinázu (IRS-PI3K). Porucha na této centrální úrovni může být příčinou některých typů obezity a inzulínové rezistence (Lin et al. 2004).

1.2. AMP aktivovaná proteinová kináza – energetický senzor buňky

Funkci tzv. metabolického senzoru eukaryotické buňky má AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMPK). Její aktivita je závislá na poměru ATP/AMP v cytoplazmě. V případě poklesu koncentrace ATP se AMPK aktivuje a rozbíhá kinázovou kaskádu orientující buněčný metabolismus z anabolického režimu na katabolický, což vede k obnově hladiny ATP. U člověka a savců obecně je AMPK zapojena do regulačních mechanismů řídících transport glukózy, glukoneogenezi, lipogenezi, oxidaci mastných kyselin a lipolýzu, viz obr. 1. AMPK tak hraje významnou roli při kontrole příjmu potravy (Andersson et al. 2004).



Obr. 1 Role AMPK v regulaci tkáňového metabolismu (upraveno podle Kopecký, Flachs, 2004)

1.3. Teorie úsporného genotypu a fenotypu

Teorie úsporného genotypu se snaží v souladu s evolučními zákonitostmi vysvětlit, proč v současné společnosti dochází ve stále větší míře k rozvoji obezity a nemocí s ní spojených. Teorie předpokládá, že v dávných dobách, kdy byl příjem potravy značně kolísavý a populace byly často sužovány hladomory, byl hospodárný metabolismus s maximální schopností ukládání energie evolučně zvýhodněn a potomci rodičů s tímto typem metabolismu měli větší šance na přežití a splození podobně úspěšných potomků. Existence těchto úsporných genů, tzv. „thrifty genes“, byla poprvé předpovězena Neelem (1992), jehož zájem byl zaměřen na využití glukózy jakožto biologického paliva. Předpokládal existenci evolučního tlaku, který by v době hladovění uchránil glukózu před spotřebováním v periferních tkáních pro potřeby mozku. Tento tlak by ve svém důsledku vedl k selekční výhodě posunující populaci směrem k inzulinové rezistenci v periferních tkáních. V naší současné civilizaci s minimálními nároky na fyzickou aktivitu a s nadbytkem vysoce kalorické potravy představují tyto úsporné geny pro své nositele riziko predisponující k patologické kombinaci obezita - DM2. Je pravděpodobné, že řada úsporných genů a dědičnost genetických polymorfismů vedoucích k malým změnám v expresích mohou činit populaci více či méně náchylnou k rozvoji obezity a diabetu (Diamond 2003). Různé úsporné geny jsou studovány a je o nich referováno v přehledových článcích (Dancott et al. 2003). Principiálně lze rozlišit dva typy úsporných genů: geny vedoucí ke zvýšenému ukládání tuku a geny stojící v pozadí inzulinové rezistence. Funkčně jsou však v úzkém sepětí, neboť vzestup anabolicky působícího inzulinu podporuje ukládání tuku v tukové tkáni, a tím rozvoj obezity, a podobně periferní tkáň (např. svalová) obézních jedinců se často stává vůči působení inzulinu rezistentní a potencuje tak jeho vyšší koncentrace (Unger 2003).

Teorii úsporného genotypu doplňuje hypotéza tzv. úsporného fenotypu. Jde o teorii poprvé nastíněnou Halesem a Barkerem (Hales, Barker 1992), která vychází z jejich klinického pozorování, že malnutrice v prenatálním, popř. v raně postnatálním období, je asociována s obezitou a diabetem v dospělosti. Hypotéza předpokládá, že fetální malnutrice způsobí alteraci metabolismu, která vede k adaptaci na nedostatek, spočívající v maximálním využití nutrientů v děloze. V pozdějším životě pak tato alterace může vést ke vzniku obezity a diabetu i za relativně přiměřeného kalorického příjmu. Adaptace metabolismu v prenatálním období spočívá v epigenetických regulacích genové exprese, jako je methylace DNA a dále chemická modifikace chromatinu enzymy (např. sirtuiny), jejichž aktivita je spojována s množstvím buněčných energetických zásob a u nižších organismů interferuje s inzulinovou

signalizací (Blandr, Guarente 2004). Důležitou úlohu v metabolických regulacích mají i vitamíny skupiny B, zejména kyselina listová. Mechanismy a regulace, které adaptace metabolismu umožňují, se mohou zřejmě uplatnit výlučně v prenatalním či raně postnatalním období a jsou navíc tkáňově specifické. Studium epigenetických změn je velmi perspektivní oblastí současného výzkumu.

1.4. Diabetes mellitus 2. typu

Diabetes mellitus dnes patří k nejrozšířenějším civilizačním chorobám. Jedná se o heterogenní skupinu onemocnění, kdy dochází k poruše glukózového metabolismu, vedoucí k hyperglykemii. Největší skupinu diabetiků představují pacienti s diabetem 2. typu, označovaným též jako non-inzulín dependentní diabetes mellitus (NIDDM). DM2 postihuje v západních státech okolo 3-5% populace a předpokládá se, že do roku 2010 světová prevalence DM2 vzroste na více než 215 miliónů nemocných (Barroso 2005). Výskyt tohoto onemocnění rapidně stoupá s věkem a se vzrůstajícím počtem obézních lidí.

V České republice bylo k 31. 12. 2004 registrováno 712 000 diabetiků (dle www.diab.cz), z toho přibližně 92% tvoří diabetici 2. typu a počet nemocných stále vzrůstá. Komplexní léčba diabetu a s ním spojených vážných chronických mikrovaskulárních a makrovaskulárních komplikací (např. nefropatie, retinopatie, ateroskleróza, diabetická noha) s sebou přináší obrovskou zátěž nejen zdravotní a společenskou, ale i ekonomickou. Je proto velice žádoucí odhalit jedince s predispozicí k tomuto onemocnění a mít tak možnost předcházet jeho demonstraci a rozvoji (např. úpravou životosprávy, dietou).

DM2 je onemocnění geneticky silně podmíněno, svědčí pro to jeho častý familiární výskyt či studie monozygotních dvojčat (Groop et al. 1996, Groop, Tuomi 1997). Individuální riziko rozvoje DM2 je dáno, jak se zdá alespoň ve většině populací, interakcí genetických faktorů a vlivu prostředí. Genetické studie DM2 se v současné době zaměřují na identifikaci specifických genetických determinant, které ovlivňují predispozici jednotlivce ke glukózové intoleranci. I přes značné úsilí, které je této problematice věnováno, zůstávají genetické příčiny nejběžnějších forem diabetu nejasné (McCarthy et al. 1994).

Genetické studie DM2 narážejí na řadu překážek (McCarthy et al. 1994, Groop et al. 1996, Groop, Tuomi 1997, Elbein 1997, Bastian 2002, Elbain 2002, McCarthy, Froguel 2002, Gloyn 2003). Největší z nich spočívá v tom, že DM2 není jednoduché homogenní onemocnění. Problematická je už samotná diagnóza diabetu a DM2 zejména. Heterogenita je patrna prakticky ve všech aspektech DM2 a je pravděpodobně výsledkem jak genetické heterogenity, tak diverzity prostředí. Genetická diverzita může být alelická (výskyt různých alel ve stejném lokusu) či nealelická (současné působení řady různých lokusů, stav glukózové tolerance je pak dán interakcí více genů (Wright et al. 2003)). Navíc u různých jedinců mohou být důležité rozdílné geny či jejich kombinace a situace se ještě komplikuje etnickými rozdíly.

Další komplikace genetického výzkumu DM2 souvisejí s neznalostí "primární" poruchy. Ke glukózové intoleranci, jejímž následkem je hyperglykémie, mohou vést různé patofyziologické cesty. Není jasné, zda místem primárního defektu jsou přímo beta-buňky pankreatu, či zda je primární porucha v působení inzulínu (Turner et al. 1989, DeFronzo et al. 1992, LeRoith 2002). Hyperglykémie může být tedy způsobena jak poruchou inzulínové sekrece, tak zvýšenou produkcí glukózy v játrech, či inzulínovou rezistencí. Řada studií dokazuje, že pro většinu pacientů je příznačná inzulínová rezistence. Studiu buněčných mechanismů, které vedou k inzulínové rezistenci, je věnována mimořádná pozornost. Inzulínová rezistence však sama není příčinou diabetu, s výjimkou vzácně se vyskytujících mutací inzulínového receptorového genu (Taylor et al. 1991). Dokud totiž beta-buňky stačí nižší citlivost periferie k inzulínu kompenzovat jeho zvýšenou sekrecí, zůstává glykémie normální. Inzulínová rezistence i zvýšený výdej glukózy játry mohou být způsobeny vysokými hladinami cirkulujících volných mastných kyselin, takže i poruchy v metabolismu lipidů stojí v pozadí DM2 (Perseghin et al. 1997). V poslední době přibývá důkazů, že v patogenezi DM2 hrají roli i zánětlivé faktory (Greenberg, McDaniel 2002, Duncan, Schmidt 2003).

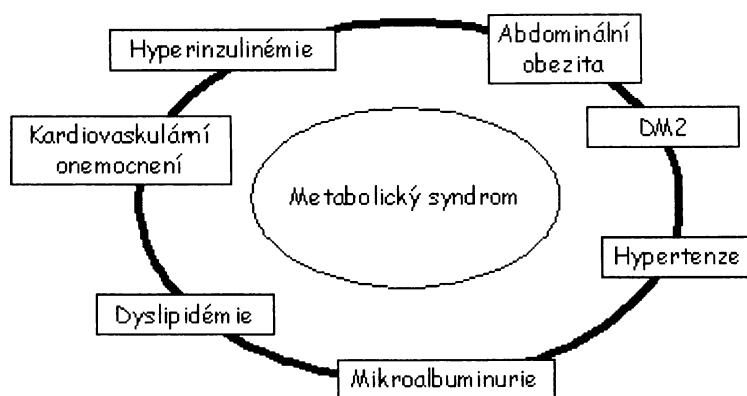
Dědičnost DM2 je, jak již bylo zmíněno, multifaktoriální. Nejlépe ji vyjadřuje model počítající s několika geny středního dopadu, které působí na polygenním pozadí za interakce s vnějšími faktory. U jedinců, kteří jsou nositeli předpokládaných diabetogenů, však nemusí nemoc vůbec propuknout (důsledek neúplné penetrance) a naopak u pacientů s DM2 nemusíme daný diabetogen prokázat (důsledek fenokopie či genetické heterogenity). Genetický model DM2 též ovlivňují pozorování zvýšeného podílu přenosu DM2 z matky na dítě (Thomas et al. 1994, Groop, Tuomi 1997) a lze tak předpokládat další mechanismy, např. parentální imprinting či vliv mitochondriálních mutací. Již je znám typ diabetu způsobený prokazatelně mutací mitochondriální DNA, jde o maternálně děděný diabetes mellitus spojený

s hluchotou (maternally-inherited diabetes and deafness, MIDD). Jsou publikovány výsledky celogenomových screeningů, které byly provedeny u mnoha různých populací. Byla identifikována řada oblastí genomu segregujících s diabetem či s některým z jeho příznaků, ale hlavním závěrem těchto studií je, že zřejmě neexistuje pro nejrozšířenější formy DM2 majoritní lokus (Elbain 2002). Většina genetických studií DM2 je založena na vyhledávání kandidátních genů. Tyto geny lze obvykle předpovědět na základě známé biochemické funkce (např. inzulin, inzulinový receptor, glukózové transportéry), nebo jsou odvozené z lidských a zvířecích modelů. Nicméně výběr těchto potenciálních kandidátů je a bude, díky pokrokům v analýze přečteného lidského genomu a pokroku v expresní (Bernal-Misrachi et al. 2003) a komparativní genomice, velmi široký. Jakmile je vybrán kandidátní gen, je screenován a jsou hledány jeho genetické varianty, často jednonukleotidové polymorfismy (SNPs). Tyto varianty jsou poté genotypovány na souborech pacientů s diabetem a u normoglykemických kontrol a zjišťuje se, zda se některá varianta vyskytuje častěji u pacientů či naopak (asociační studie). I když bylo studováno více než 200 kandidátních genů, výsledky nejsou zatím příliš povzbudivé. Opakovaně byly potvrzeny asociace DM2 pouze s polymorfismy v genech *PPARGgamma2* a *KCNJ11* (Gloyn 2003). Oběma genům a asociacím jejich polymorfismů s diabetem je věnována příložená publikace – viz PUBLIKACE 1: **Vejražková et al. Dva nadějně kandidátní geny v etiopatogenezi DM2 - PPAR γ 2 a KCNJ11. Čas Lék Česk. 2005;144(11):721-725.**

Řada pozitivních výsledků nebyla v jiných populacích reprodukována. Důvodem může být populační stratifikace či mnohdy nedostatečná a nejednotná fenotypizace. Je stále zřejmější, že pro identifikaci skutečných genetických asociací jsou nezbytné co nejpočetnější soubory. Nedávné publikace doporučují, jak navrhnout asociační studie, aby jejich výsledky vedly k definitivním výsledkům a bylo možné vystopovat interakce gen-gen, gen-prostředí (Cardon, Bell 2001, McCarthy, Froguel 2002). Výsledky mnoha předchozích asociačních studií musí být proto revidovány na velkých populačních vzorcích spolu s extenzivní genetickou a funkční analýzou dané oblasti (Elbain 2002).

1.5. Metabolický syndrom, obezita a adipokiny

DM2 je často doprovázen obezitou. Obezita sama je multifaktoriální onemocnění, které je silně geneticky determinováno. Bylo publikováno mnoho studií zjišťujících asociaci genů či chromozomálních oblastí s ukazateli obezity, s hmotnostními změnami, s energetickým výdejem či respiračním kvocientem. Podobně jako v případě DM2, i v souvislosti s obezitou již bylo diskutováno více než 250 nadějných genetických markerů. Vše nasvědčuje tomu, že obezita a DM2 mohou být projevem z velké části společného genetického základu. Navíc se zdá, že DM2 je pouze součástí ještě komplexnějšího tzv. metabolického syndromu (Reaven 1988, Perseghin et al. 1997, Koyama et al. 1997, Colagiuri et al. 1997) – obr. 2.



obr. 2 Nejdůležitější složky metabolického syndromu

Metabolický syndrom, označovaný také jako Reavenův metabolický syndrom či syndrom X, zahrnuje celou řadu metabolických poruch, zásadní je však přítomnost glykoregulační poruchy ve smyslu inzulínové rezistence. Inzulínorezistence a následná hyperinzulinémie vedou k poruchám metabolismu lipidů, což se projevuje hypercholesterolémií, poklesem HDL cholesterolu a hypertriacylglycerolémií. Dyslipoproteinémie zvyšuje riziko aterosklerózy. Mezi další hlavní složky patří esenciální hypertenze, obezita androidního typu, koagulační poruchy, někdy jsou tyto změny provázány též hyperurikémií a přidružený mohou být též psychické poruchy.

Metabolický syndrom je v naší populaci velmi rozšířen, některá z jeho složek postihuje během života až přes 50 % jedinců (Svačina 2004). Opět se při jeho rozvoji uplatňuje genetická dispozice a důležitou roli hraje prostředí a životospráva. Tuková tkáň je

významný sekreční orgán vylučující mnoho hormonů a dalších působků, které ovlivňují vyjádření jednotlivých složek metabolického syndromu. Zmnožená tuková tkáň u obézních osob a zejména viscerální tuk mají výrazný podíl na patogenezi metabolického syndromu a jeho komplikací. V současné době je stále častěji přijímána teorie, že centrální poruchou metabolického syndromu je viscerální obezita a inzulínová rezistence je sekundárním jevem. Například je dobře znám diabetogenní vliv vyšších hladin volných mastných kyselin, kdy dochází k interferenci glukózového a lipidového metabolismu. Mastné kyseliny uvolněné z viscerálního tuku mohou prostřednictvím portálního oběhu přímo ovlivňovat metabolické procesy v játrech (Bergman 2000). Popsán je i přímý lipotoxický vliv na beta-buňky pankreatu. Hormon angiotenzinogen produkovaný tukovou tkání je jedním z mechanismů, který může vysvětlovat vztah obezity k esenciální hypertenzi.

Nedlouho známým fenoménem je sekrece tzv. adipokinů, tedy cytokinů produkovaných adipocyty. Nejvýznamnějším objevem byla identifikace **leptinu** v roce 1994, neboť tento proteohormon je významným regulátorem energetické rovnováhy (Friedman 2002). Je tvořen 167 aminokyselinami a je produkován převážně tukovou tkání. Za normálních okolností pozitivně koreluje výše hladiny leptinu s množstvím tukové tkáně v organismu. Z větší části je v krvi cirkulující leptin vázán na proteiny, volný leptin má schopnost působit na hypothalamická centra regulující příjem potravy. U zdravých lidí je mechanismus takový, že zmnožení tukové tkáně se odrazí ve vzestupu koncentrace leptinu, což vede ke snížení chuti k jídlu a ke zvýšení energetického výdeje. Naopak dojde-li k redukci tukové tkáně v těle, koncentrace leptinu poklesne a důsledkem je stimulace příjmu potravy a snížení energetického výdeje. Jde však pouze o modelový popis účinku leptinu, neboť i u osob téže tělesné konstituce, věku a pohlaví existuje značná heterogenita v koncentraci leptinu. Do značné míry je způsobena tím, že koncentrace leptinu je kromě množství podkožního tuku závislá též na aktuální energetické bilanci organismu (Levine, Billington 1998). Problematice koncentrace proteohormonu leptinu u obézních dětí a změnám v jeho koncentraci po absolvování redukčního pobytu v dětské léčebně je věnována příložená publikace – viz **PUBLIKACE 2: Šrámková et al. Korelace leptinu s antropometrickými parametry během redukční léčby obézních dětí. Sborník 2002;103(4):487-494.**

Objev leptinu vyvolal velký zájem o další možné hormony produkované tukovou tkání. V současné době je známo již několik desítek těchto působků. Jak se však ukázalo, mnoho z nich je primárně secernováno i jinými tkáněmi než je tkáň tuková, zejména imunokompetentními buňkami-makrofágy, takže význam jejich produkce adipocyty je stále

předmětem výzkumu. Mezi nejsledovanější a nejdiskutovanější hormony z této řady patří adiponektin a rezistin.

Adiponektin je hormon, jehož koncentrace v krvi patří k nejvyšším, pohybuje se řádově v $\mu\text{g/ml}$ a tvoří tak téměř 0.01% všech plazmatických proteinů. Jedná se o protein sestávající z 244 aminokyselin, jejíž struktura je vysoce homologní s kolagenem VIII, X a s komplementem C1q (Maeda et al. 2001). Hladiny adiponektinu jsou na rozdíl od leptinu u obézních osob sníženy a nižší jsou také u osob trpících aterosklerózou a diabetem 2. typu (Rajala, Scherer 2003, Goldstein, Scalia 2004, Weyer et al. 2001, Arita et al. 1999, Yokota et al. 2000, Ouchi et al. 1999, Hotta et al. 2001). Adiponektinová signalizace zahrnuje adenosin monofosfátem aktivovanou proteinovou kinázu (AMPK), buněčný energetický senzor, aktivovaný v odpověď na pokles intracelulárního ATP. AMPK, jak již bylo zmíněno, hraje klíčovou roli v nejrůznějších metabolických procesech, včetně suprese jaterní glukoneogeneze, podpory vychytávání glukózy v kosterním svalu, oxidace mastných kyselin, inhibice lipolýzy a dalších. Její příznivé působení na metabolismus je součástí léčivého efektu metforminu (Goldstein, Scalia 2004, Zou et al. 2004). Adiponektin moduluje řadu biologických funkcí. Studie ukazují, že v endoteliálních buňkách a v makrofázích má protizánětlivé účinky (Yokota et al. 2000, Ouchi et al. 1999). Experimentální podání adiponektinu pokusným zvířatům vede ke zvýšené oxidaci tuků a zlepšuje citlivost k inzulinu (Yamanuchi et al. 2001). I u lidí bylo pozorováno, že hladiny adiponektinu jsou do velké míry prediktorem inzulinové senzitivity, a to nezávisle na množství a distribuci tělesného tuku (Tschritter et al. 2003). Přímé spojení adiponektinu s množstvím tělesného tuku spočívá v tom, že snížení tělesné hmotnosti zvyšuje plazmatickou koncentraci adiponektinu. Tento fakt při současném poznávání příznivého účinku adiponektinu na metabolismus glukózy a na cévní stěnu přispívá k biologickému vysvětlení přínosného vlivu snížení nadváhy obézních osob, zejména pokud jde o zmenšení rizika DM2 a kardiovaskulárních chorob. Adiponektin se tak zdá být nadějným hormonem s možným uplatněním při léčbě diabetu a obezity. Klinické studie zabývající se tematikou adiponektinu jsou tedy velice aktuální a příspěvkem k nim je zařazená publikace – viz PUBLIKACE 3: **Vrbíková et al. Determinants of circulating adiponektin in women with polycystic ovary syndrome. Gynecol Obstet Invest 2005;60(3):155-161.**

Dalším nedlouho známým hormonem, jehož koncentrace je podobně jako u leptinu vyšší u obézních osob a který po injekčním podání pokusným zvířatům snižuje citlivost k inzulinu, je **rezistin**. Pojmenován byl právě podle své schopnosti indukovat rezistenci

k inzulínu. Tento hormon představuje zajímavé přímé pojítka mezi obezitou a DM2. Nejnovější poznatky o rezistinu jsou shrnuty v přehledovém článku – viz PUBLIKACE 4: **Šrámková et al. Rezistin-klíč k inzulínové rezistenci? DMEV 2002;5(4):225-228**, který je součástí dizertační práce.

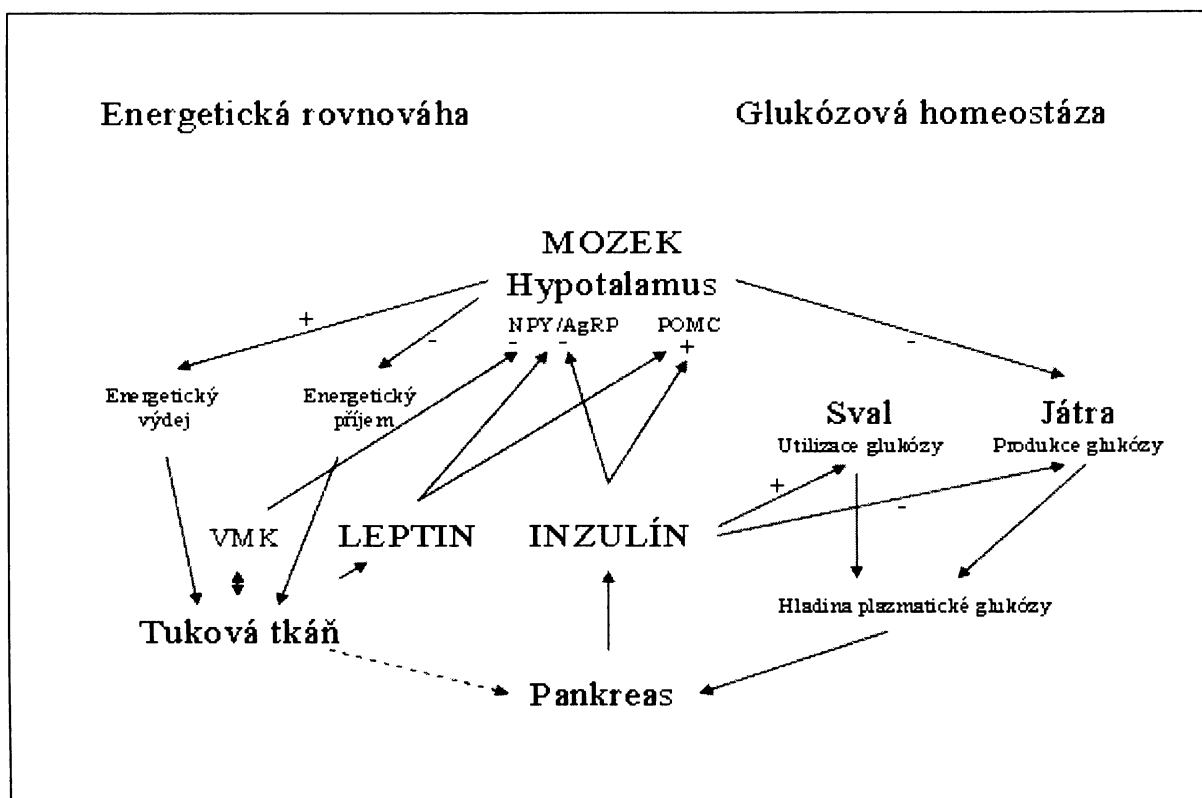
Mezi hormony zapojené do regulace příjmu potravy patří **ghrelin**. Jde o krátký peptid složený z 28 aminokyselin produkovaný převážně buňkami žaludku. Ghrelin vykazuje orexigenní aktivitu nepřímým účinkem na hypothalamická jádra (nucleus arcuatus). Kromě zvyšování chuti k jídlu má ghrelin též schopnost snižovat výdej energie (Wren et al. 2000). Studium ghreluinu a jeho funkcí je tedy velice zajímavé z hlediska možného uplatnění při léčbě obezity. Tento hormon je spolu s adiponektinem sledován v přiložené publikaci – viz PUBLIKACE 3: **Vrbíková et al. Determinants of circulating adiponektin in women with polycystic ovary syndrome. Gynecol Obstet Invest 2005;60(3):155-161.**

1.6. Neurocentrický model

Inzulínová rezistence, která vznikla v důsledku nadbytku tukové tkáně, byla dosud považována za pojítka mezi obezitou a DM2. Z tohoto předpokladu vychází i tzv. neurocentrický model. Je založen na čtyřech hlavních poznatcích:

1. Mozek není necitlivý vůči působení inzulínu (viz kapitola 1. 1.), naopak reaguje na inzulínovou, leptinovou a nutriční signalizaci a reguluje tak množství tělesného tuku a jaterní inzulínovou senzitivitu.
2. Narušení této nervové signalizace se může projevit hyperfágií, následným hmotnostním přírůstkem a jaterní inzulínovou rezistencí.
3. Obezita je silně asociována s rezistencí na inzulín a leptin.
4. Defekt inzulínové sekrece, který vede k nedostatku tohoto působku v periférii i mozku, je základním předpokladem k rozvoji DM2.

Neurocentrický model tedy popisuje situaci, kdy snížená neuronální inzulínová a leptinová signalizace vede ke zvýšenému množství tuku a tento stav propojuje s poruchou metabolismu glukózy, viz obr. 3.



Obr. 3. Neurocentrický model popisující působení adipokinů a nutričních signálů přes hypotalamus (upraveno podle Schwartz, Porte 2005).

1.7. Syndrom polycystických ovarií

Syndrom polycystických ovarií, PCOS, byl poprvé popsán v roce 1935 Steinem a Leventhalem, dnes je však pod označím PCOS rozuměn širší soubor změn než původně vymezoval tzv. Steinův-Leventhalův syndrom (Cibula et al. 2004). Diagnostická kritéria PCOS prošla dlouhým vývojem (Dunaif 1997, Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome), neboť tento syndrom kromě gynekologických komplikací zahrnuje řadu dalších metabolických a endokrinních abnormalit, včetně častějšího výskytu diabetu. V současné době se používají zejména diagnostická kritéria definovaná tzv. rotterdamským konsensem skupinou ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome).

Jde o velice rozšířené onemocnění, jehož diagnostická kritéria splňuje 5-10% žen reprodukčního věku (Waterworth 1997). Diagnózu lze stanovit pouze na podkladě kombinace klinických a laboratorních příznaků, při hraničně vyjádřených hlavních kritériích je třeba

přihlédnout ke kritériím vedlejším. Mezi hlavní kritéria se řadí anovulační cykly, oligomenorea či amenorea, zvýšená hladina celkových i volných androgenů (testosteron, androstendion, dehydroepiandrosteron, dehydroepiandrosteronsulfát) a poměr luteinizačního ku folikulostimulačnímu hormonu zvýšený nad 1,5. Důsledkem zvýšené hladiny androgenů může být i periferní inzulínová rezistence, neboť androgeny mohou zvyšovat lipolytickou aktivitu v adipocytech, zvyšovat tak přísun mastných kyselin do jater, snižovat clearance inzulínu a ve svém důsledku tedy zvyšovat hladinu inzulinémie. U žen s PCOS byla prokázána i zvýšená časná fáze sekrece inzulínu pankreatem.

K vedlejším kritériím patří typická morfologie ovaríí na ultrazvukovém vyšetření, kdy je nalézáno zvětšené ovarium s periferním uspořádáním většího množství folikulů nepřesahujících v průměru 1cm. Tyto změny se mohou nacházet pouze na jednom z ovaríí a nejde o zásadní diagnostické kritérium PCOS, jakkoliv by tomu pojmenování syndromu nasvědčovalo, neboť obraz polycystických ovaríí se vyskytuje u 15-20% žen fertillního věku. Dalším vedlejším kritériem PCOS je typický histologický obraz z biopsie ovaríí, především zmnožené atretické folikuly a zesílená tunica albuginea. Toto vyšetření však není v současnosti k diagnóze onemocnění nutné, ačkoliv v minulosti bylo jedním z rozhodujících kritérií pro diagnózu PCOS. Vedlejšími kritérii jsou dále snížená hladina hormonu SHBG (sex-hormon binding globulin) a kožní androgenní příznaky, jimiž jsou hirsutismus a akné nereagující na topickou léčbu a přetrvávající i po dvacátém roce věku. Kožním projevem hyperandrogenémie může být i acanthosis nigricans, tedy ztluštělé a hyperpigmentované okrsky kůže s nejčastějším výskytem na zadní straně krku, v axilách a v okolí vulvy.

Vysoká hladina androgenů ovlivňuje nepříznivě i metabolismus lipidů. Ženy s PCOS mají často vysokou hodnotu aterogenního indexu (poměr LDL ku HDL cholesterolu) a vyšší hladinu triacylglycerolů. Zvýšené je i zastoupení žen s viscerální obezitou. Hyperinzulinémie spolu se zvýšeným objemem viscerálního tuku a s vyšší hladinou triacylglycerolů působí nepříznivě na koagulační parametry, takže především obézní pacientky s PCOS mají výrazně sníženou fibrinolytickou kapacitu. Je zřejmé, že některé z vedlejších diagnostických kritérií PCOS se shodují s již výše popsanými složkami metabolického syndromu. Právě tímto tématem se zabývá zařazená publikace – viz PUBLIKACE 5: **Vrbíková et al. Metabolic syndrome in young Czech women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod 2005 Dec; 20(12):3328-3332.**

V souvislosti s PCOS byly popsány různé typy dědičnosti. Jde o onemocnění s familiárním výskytem, dosud však není zřejmé, zda se v přenosu uplatňuje spíše monogenní dědičnost s variabilní expresivitou modifikovaná faktory prostředí a širokým genetickým

pozadím, či jde spíše o polygenní dědičnost s významným vlivem prostředí. Vzhledem k výrazné fenotypické variabilitě onemocnění je však model monogenní dědičnosti nepravděpodobný. V souvislosti s PCOS, konkrétně se zvýšenou hladinou testosteronu, je zkoumána variabilita v genu *CYP17*, což je gen kódující enzym zodpovědný za štěpení postranních řetězců molekul hormonů v průběhu steroidogeneze. Probíhají výzkumy pátrající po genu zodpovědném za zvýšenou sekreci inzulinu a po dalších genech, které by pomohly osvětlit dědičné faktory predisponující k rozvoji onemocnění (Bendlová 2004).

1.8. Studované kandidátní geny

V následujících odstavcích jsou stručně představeny vybrané kandidátní geny a jejich studované polymorfismy. Vždy jsou uvedeny konkrétní vazby genu na energetický metabolismus. Připojen je odkaz na publikace zařazené do dizertační práce, které gen a jeho funkce popisují velice podrobně, popř. dokládají závěry našeho výzkumu.

1.8.1. Gen *PPARgamma2*

PPARgamma2 představuje zkratku pro peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. Tak zvané peroxisómové proliferátory, PPARs, byly objeveny v roce 1990 (Issemann et al. 1990). Jde o nukleární receptory (Vamecq et al. 1999). Gen kódující typ *PPARgamma2* má 9 exonů a délkou přesahuje 100 kb (Fajas et al. 1997). Lokalizován byl do oblasti 3p25 (Vigouroux et al. 1998). Bylo prokázáno, že *PPARgamma* je hlavním regulátorem adipogeneze (Spiegelman 1998). Jako transkripční faktor reguluje stěžejní mechanismy v diferenciaci adipocytů.

Polymorfismy v tomto genu jsou asociovány s obezitou a složením těla (Valve et al. 1999, Ristow et al. 1998, Auwerx 1999, Memisoglu et al. 2003, Kim et al. 2004) a též s inzulinovou senzitivitou a DM2 (Altshuler et al. 2000, Lohmueller et al. 2003, Buzzetti et al. 2004). V rámci postgraduálního studia byly teoretické poznatky o genu a jeho funkci zpracovány v publikaci – viz PUBLIKACE 6: **Šrámková et al. Gen *PPARγ* ve středu zájmu obezitologů a diabetologů. DMEV 2001;4(4):278-286.** Na základě těchto znalostí byla dále cíleně sledována dvě místa polymorfismu: běžná substituce Pro12Ala a velmi vzácná Pro113Gln, uváděná dříve v literatuře pod označením Pro115Gln.

Polymorfismus Pro12Ala

Substituce aminokyseliny prolinu za alanin ve 12. kodónu exonu B genu se vyskytuje ve střední Evropě přibližně u 12% populace. Tato záměna aminokyseliny vede ke snížené

vazebné afinitě k DNA. To má za následek nižší schopnost transaktivovat odpovídající promotory cílových genů. V důsledku toho může tento polymorfismus přispívat k variabilitě v množství tukové tkáně a ve schopnosti reagovat na inzulín (Buzzetti et al. 2004, Kim et al. 2004, Lohmueller et al. 2003, Memisoglu et al. 2003, Frederiksen et al. 2002, Altshuler et al. 2000, Valve et al. 1999, Deeb et al. 1998). Závěry mnohých výzkumů však nejsou zdaleka jednoznačné. Nasvědčují spíše recesivnímu typu projevu minoritní varianty ve fenotypických znacích syndromu inzulínové rezistence (Kolehmainen et al. 2003, Frederiksen et al. 2002, Hasstedt et al. 2001, Oh et al. 2000). Závěry naší studie asociací polymorfismu Pro12Ala s obezitou a DM2 jsou zpracované v příložené publikaci – viz PUBLIKACE 7: **Šrámková et al. Is a Pro12Ala polymorphism of the PPARgamma2 gene related to obesity and type 2 diabetes mellitus in the Czech population? Ann N Y Acad Sci 2002 Jun;967:265-273.**

Mutace Pro113Gln

Vzhledem k extrémně vzácnému výskytu substituce aminokyseliny prolinu za glutamin ve 113. kodónu v 6. exonu genu není přesné používat termínu polymorfismus, proto bude pojednáváno o mutaci. Je znám její mechanismus účinku: zařazení aminokyseliny glutaminu vede k trvale aktivní formě PPARgamma2, neboť je tak znemožněna fosforylace serinu v kodónu 112. Tato fosforylace za normálních okolností působí na aktivitu proteinu inhibičně. Zvýšená aktivita PPARgamma2 se promítne v tzv. up-regulaci proteinů nutných pro lipogenezi. Výsledkem je akcelerace diferenciacie adipocytů a rozvoj těžké obezity. Proto byla mutace Pro113Gln sledována pouze u obézních jedinců.

1.8.2. Gen *UCP1*

Rozpřahovací protein 1 (uncoupling protein 1, UCP1) patří do rodiny protonoforů umístěných ve vnitřní membráně mitochondrií (Cinti et al. 1989). Funkcí je rozpřažení elektronového toku, spojeného při procesu aerobní respirace s translokací vodíkových iontů do mezimembránového prostoru, od oxidativní fosforylace. Působením rozpřahovacích proteinů není energie oxidovaných substrátů uskládána ve formě ATP, ale je uvolňována ve formě tepla (Klingenberg et al. 1990). Gen pro UCP1 je lokalizován na 4. chromozomu (4q31) a exprimován je v hnědé tukové tkáni. Výskyt hnědého tuku u dospělého člověka je omezený na adipocyty disperzně rozptýlené v bílé tukové tkáni, zejména v oblastech okolo velkých cév, v perirenální a axilární oblasti (Garruti et al. 1992, Hany et al. 2002, Minotti et al. 2004, van Marken Lichtenbelt et al. 2003, Yang et al. 2003). Expresí genů typických pro hnědou tukovou tkáň však není ani u dospělých zanedbatelná. Proto by indukce UCP1 mohla

mít význam z hlediska hospodaření s energií a studium polymorfismů v genu by mohlo přinést zajímavé poznatky ve vztahu k obezitě a DM2.

Polymorfismus A-3826G

Úzká souvislost byla nalezena mezi množstvím mRNA *UCP1* genu ve viscerálním tuku a polymorfismem A-3826G v promotorové oblasti (Esterbauer et al. 1998). Alelická frekvence v evropské populaci se pohybuje okolo 75% pro alelu A a 25% pro alelu G. V literatuře byla popsána vyšší frekvence alely G u pacientek trpících DM2 a také asociace této alely s hladinou lačné glykémie u těchto diabetiček, nezávisle na BMI (Heilbronn et al. 2000). Nalezena byla též snížená schopnost postprandiální termogeneze u homozygotních nositelů alely G (Nagai et al. 2003). Vzhledem k tomu, jak důležitou roli hraje viscerální tuk v etiopatogenezi diabetu a jak úzce je schopnost postprandiální termogeneze spjata s obezitou, rozhodli jsme se studovat tento polymorfismus a zhodnotit jeho případnou asociaci s biochemickými a antropometrickými parametry. Studie – viz PUBLIKACE 8: **Šrámková et al. The UCP1 Gene Polymorphism A-3826G in Relation to DM2 and Body Composition in Czech Population** byla přijata k publikaci ve druhém čísle časopisu ECED (Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes) roku 2007.

1.8.3. Gen *KCNJ11*

Gen *KCNJ11* (zkratka je odvozena od rodiny genů zvané Potassium channel inwardly rectifying, podrodiny J, člen 11) kóduje tak zvaný Kir6.2 (inwardly rectifying potassium channel) protein. Kir6.2 tvoří podjednotku ATP dependentního K⁺ kanálu, který se podílí na regulaci inzulínové sekrece pankreatických beta-buněk (Koster et al. 2000). Tento kanál je proteinový komplex tvořený dvěma podjednotkami: sulfonylureovým receptorem (SUR1) a podjednotkou formující vlastní pór kanálu (Kir6.2). Fluorescenční hybridizací in situ byl gen *KCNJ11* mapován do oblasti 11p15.1 (Thomas et al. 1995, Inagaki et al. 1995). Další přehled o funkci genu a o jeho významu v regulaci energetického metabolismu přináší zařazený přehledový článek – viz PUBLIKACE 9: **Šrámková et al. Alterované draselné kanály beta buněk a jejich role v patogenezi diabetes mellitus 2. typu. DMEV 2005;8(1):18-22.**

Polymorfismus E23K

Mutace a polymorfismy, které snižují aktivitu ATP dependentního K⁺ kanálu, mohou vést k vyšší citlivosti beta-buněk vůči ATP a potencovat tak sekreci inzulínu. Polymorfismus

E23K (záměna obvyklé aminokyseliny glutaminu za lysin ve 23. kodónu genu) genu *KCNJ11* naopak citlivost beta-buněk vůči ATP snižují, což vede ke zvýšení prahové koncentrace ATP potřebné pro sekreci inzulínu. Tento polymorfismus proto hraje významnou úlohu v glukózovém metabolismu. Byla popsána asociace homozygotního K23K i heterozygotního E23K genotypu s DM2 (Gloyn et al. 2003, Hani et al. 1998). Z elektrofyziologických studií lidských izoform genu kódujícího Kir6.2 vneseného do COS-1 buněk vyplývá, že schopnost varianty 23K snižovat citlivost kanálu na ATP vykazuje efekt dávky a je proto výraznější v homozygotní konstelaci (Schwanstecher et al. 2002). Ve vztahu k DM2 byl popsán též synergický efekt polymorfismu E23K genu *KCNJ11* a výše uvedeného polymorfismu Pro12Ala genu *PPARGgamma2* (Hansen et al. 2005).

2. CÍL A KONCEPCE

Hlavním cílem předkládané dizertační práce je na základě studia tematicky zvolených genetických polymorfismů a hormonů přispět k poznání faktorů, které se podílejí na regulaci energetického metabolismu. Zvláštní pozornost je věnována metabolismu základního zdroje energie, glukózy. Zvolené geny, *PPARGgamma2*, *UCP1* a *KCNJ11*, jsou tzv. kandidátními geny ve vztahu k obezitě, DM2 a jeho komplikacím, resp. k metabolickému syndromu u české populace. Hormony tukové tkáně jsou, jak se v posledních letech ukazuje, rozhodujícím faktorem v regulaci příjmu potravy. Dizertační práce přináší nové znalosti o čtyřech z nich: leptinu, rezistinu, adiponektinu a gastrointestinálním hormonu ghrelinu.

Práce je koncipovaná jako soubor devíti publikací, jimž předchází podrobný úvod do problematiky a dále klinická a metodická část. Pět ze zařazených publikací jsou původní studie, z nichž čtyři jsou publikované v zahraničních impaktovaných odborných časopisech a jeden v odborném časopise českém. Čtyři publikace se řadí k tzv. přehledovým článkům, které shrnují nejnovější poznatky v dané problematice. Soubor příložených publikací je opatřen krátkým doplňkem a dizertační práci ukončuje závěrečný souhrn.

Splnění cílů předpokládalo:

- 1) Kompletizaci studovaných souborů diabetiků 2. typu, potomků diabetiků 2. typu, obézních jedinců, pacientek s PCOS a kontrolních jedinců, včetně
 - a. průběžné tvorby DNA banky a
 - b. podrobnou antropometrickou a klinicko-biochemickou charakterizaci jedinců.
- 2) Tvorbu elektronické databáze.
- 3) Zavedení a optimalizaci molekulárně genetických metod DNA analýzy, konkrétně
 - a. metody PCR (polymerase chain reaction),
 - b. metody RFLP (restriction fragment length polymorphism) a
 - c. metody SSCP (single strand conformational polymorphism).
- 4) Genotypizaci vybraných polymorfismů v kandidátních genech.
- 5) Studium asociací genetických polymorfismů či koncentrací sledovaných hormonů s fenotypickými projevy u studovaných souborů.
- 6) Statistickou analýzu dat.

3. KLINICKÁ A METODICKÁ ČÁST

3.1. Studované soubory

Předmětem studia bylo několik dobře vymezených souborů. Jednak šlo o soubor pacientů s jasnou diagnózou diabetes mellitus 2. typu podle kritérií World Health Organisation (World Health Organization 1999). Diabetes u pacientů musí být diagnostikován mezi jejich 30.-60. rokem. Pacienti s diabetem, kteří jsou léčeni inzulinem, mohou být zařazeni do studie pouze tehdy, jestliže jejich léčba inzulinem nebyla indikována dříve než po roce od diagnózy DM2. Pacienti s DM2 byli rekrutováni jednak z pacientů Endokrinologického ústavu, jednak díky pomoci mnoha oslovených diabetologů (zejména Prof. MUDr. Terezii Pelikánové, DrSc., z Diabetologického centra IKEM). Vedle tohoto souboru byl výzkum zaměřen na přímé potomky diabetiků, tj. na jedince, jejichž jeden nebo oba rodiče trpí DM2. Další soubor tvořili obézní jedinci s BMI>30 (spolupráce s Doc. MUDr. Vojtěchem Hainerem, CSc., a Doc. MUDr. Marií Kunešovou, CSc., z EÚ) a dále pacientky splňujících diagnostická kritéria syndromu polycystických ovarií definovaná tzv. rotterdamským konsensem (The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group 2004). Důležitá byla též charakterizace rozsáhlého kontrolního souboru, tvořeného neobézními jedinci bez zdravotních potíží a s negativní rodinnou anamnézou pro DM2. Obecným kritériem pro zařazení do studie bylo stáří více než 20 let a česká národnost. Kompletizace těchto souborů byla organizačně velmi náročná a vyžadovala širokou informační a inzerční kampaň. V letech 1999-2006 bylo v Endokrinologickém ústavu podrobně vyšetřeno přes 1000 osob.

3.2. Charakterizace souborů

Velký důraz byl kladen na detailní charakterizaci probandů. Soubory musí být co nejrozsáhlejší a musí být k dispozici široká škála fenotypických parametrů. Protokol studie byl schválen Etickou komisí Endokrinologického ústavu a byl optimalizován tak, aby se při daných požadavcích minimalizovalo množství odebírané krve. Potomci diabetiků a zdravé kontroly se kromě podrobného antropometrického vyšetření a stanovení základních a speciálních laboratorních parametrů (Tab. 1 a Tab. 2) podrobili i dvěma funkčním testům – tříhodinovému orálnímu glukózovému tolerančnímu testu a 15-ti minutovému inzulinovému tolerančnímu testu.

Pacientky se syndromem PCOS a vybrané vhodné kontrolní dobrovolnice podstoupily vyšetření inzulínové senzitivity euglykemickým hyperinzulinemickým clampem.

Informovaný souhlas – Každý pacient či kontrolní jedinec byl po příchodu do ordinace podrobně informován o studii, o průběhu vyšetření, byl seznámen s obsahem dotazníku, s průběhem antropometrického měření a odběrem krve ke genetickému vyšetření. Pacient byl poučen, že jeho osobní i anamnestická data neposkytneme další osobě, že data budou statisticky vyhodnocována a publikována v odborném tisku bez uvedení osobních údajů a budou použita pouze k výzkumným účelům. Dále byl pacient informován o možnosti zeptat se na detaily studie lékaře a na možnost kdykoliv ze studie vystoupit bez udání důvodu. Svůj souhlas s účastí ve studii stvrzuje každý účastník podpisem.

3.2.1. Vyšetřovací metody

Základní klinické vyšetření a funkční testy probíhaly v Laboratoři funkčních testů vedené Doc. MUDr. Karlem Vondrou, DrSc.. Pacient byl před každým testem vyšetřen lékařem. Lékař prověřil osobní anamnézu i aktuální zdravotní stav a poté rozhodl o provedení testu. Před zahájením vyšetření byl pacientovi změřen krevní tlak a zjištěna lačná glykémie. Před provedením inzulínového tolerančního testu bylo navíc provedeno EKG. Z funkčních testů byly vyloučeny osoby, které mají diagnózu DM2, srdeční choroby, cévní choroby, mají lačnou glykémii vyšší než 7 mmol/l nebo užívají léky ovlivňující sledované biochemické parametry.

Orální glukózový toleranční test (OGTT) slouží k odkrytí manifestního diabetes mellitus a porušené glukózové tolerance (latentního diabetes mellitus). Nalačno je odebráno 50 ml krve pro bazální vyšetření, poté dobrovolník vypije 75g rozpuštěné glukózy, a pak je v půlhodinových intervalech odebíráno po 5 ml krve. Krev je odebírána z kanyly zavedené v loketní jamce. Odběry prováděné v 30 minutových intervalech slouží k biochemickým vyšetřením (viz Tab. 3). Před zahájením i po skončení testu je měřen krevní tlak a sledována aktuální glykémie. Vyšetření trvá 3 hodiny a probíhá v sedě, pod dozorem lékaře a k dispozici je dostatečný počet zdravotních sester. Po skončení tohoto testu je obvykle prováděno antropometrické vyšetření.

Inzulínový toleranční test (ITT) zjišťuje periferní účinnost inzulínu, tj. slouží k posouzení inzulínové senzitivity. Nalačno je vpíchnuto malé množství inzulínu do krve (0,1U/kg tělesné hmotnosti) a v minutových intervalech je odebíráno malé množství krve ke zjištění glykémie. Krev je odebírána z kanyly zavedené v loketní jamce. Před zahájením testu

je provedeno EKG a změřen krevní tlak. Během testu je sledována klesající glykémie. Test trvá 15 minut a po skončení testu je snížená hladina glukózy v krvi normalizována snídaní, kterou si každý přinese sám. Snídaně musí obsahovat sladký nápoj, dále sladké pečivo nebo čokoládu a pečivo např. se sýrem apod. Pacient je o potřebném množství a složení snídaně předem informován. Vyšetření probíhá vleže, individuálně, za přítomnosti lékaře a dostatečného počtu zdravotních sester. K provedení tohoto testu je nutné doporučení lékaře na základě vstupních vyšetření a zjištění osobní anamnézy. Celková délka testu i s normalizováním glykémie je obvykle 1,5-2 hodiny.

Euglykemický hyperinzulinemický clamp je považován za zlatý standard přímého testování účinku inzulínu in vivo (Venkatesan et al. 2001). Inzulínová senzitivita je hodnocena podle množství glukózy, kterou je třeba testovanému jedinci dodat, aby při standardně zvolené hyperinzulinémii (zajišťované konstantní infuzí inzulínu) byla udržovaná konstantní požadovaná fyziologická glykémie. Rychlost infuze glukózy je regulována podle glykemií měřených v desetiminutových intervalech. Inzulínová rezistence je pak definována jako pokles spotřeby glukózy pod 25., popř. 10. percentil hodnot získaných v tzv. normální populaci.

Antropometrické vyšetření - Byla měřena tělesná hmotnost ve spodním prádle, 11 výškových měř, 12 šířkových měř, 14 obvodových měř a 14 kožních řas. Bylo zjišťováno tělesné složení, tj. množství podkožního tuku, svalové hmoty a kostní hmoty. Měření se provádělo diskrétně, v uzavřené místnosti v přítomnosti měřitele (antropologa) a zapisovatele. Výsledky měření byly zpracovávány pomocí programu ANTROPO (Bláha 1991).

Odběr genetického materiálu

DNA byla izolována z leukocytů odebrané nesrážlivé periferní krve (plazma je využita pro klinicko-biochemická stanovení). Vyizolovaná DNA je uchovávána v genetické bance pod číselným kódem.

3.2.2. Sledované klinicko-biochemické parametry

Po nočním lačnění byly účastníkům studie odebrány vzorky periferní žilní krve (srážlivé 25ml, nesrážlivé 25ml) a byly stanovovány následující klinicko-biochemické parametry (Tab.1-3):

Tab. 1 Sérové parametry stanovené po nočním lačnění

Parametr	Jednotky	Metoda stanovení	Norma EÚ
Glykémie	mmol/l	Glukózooxidázová metoda, Backman Glucose Analyzer 2	3,6-5,6
C-peptid	nmol/l	IRMA, Immunotech	0,3-0,9
Inzulín	mIU/l	IRMA, Immunotech	5-22
Proinzulín	pmol/l	ELISA, DRG Diagnostics, Germany	< 10 nalačno
Glykovaný hemoglobin	%Hb	HPLC, BioRad Analyzer	2,9-5,8
Glykované proteiny	mmol/l	Spektrofotometrie NBT, Merck Vitalab Eclipse	< 1,6
Celkový cholesterol	mmol/l	Metoda CHOD-PAP, Merckotest, Merck Vitalab Eclipse	3,7-5,2
HDL-cholesterol	mmol/l	Metoda CHOD-PAP, Merck Systém Cholesterin, Merck Vitalab Eclipse	>1,2
LDL-cholesterol	mmol/l	Výpočet*	< 3,8
Triacylglyceroly	mmol/l	Metoda GPO-PAP, Merck Systém, Merck Vitalab Eclipse	0,68-1,85
Alaninaminotransferáza (ALT)	μkat/l	IFCC metoda s pyridoxal fosfátem, Cobas Integra, Roche Diagnostics	0,17-0,83
Aspartátaminotransferáza (AST)	μkat/l	IFCC metoda s pyridoxal fosfátem, Cobas Integra, Roche Diagnostics	0,16-0,62
Gamaglutamyltransferáza (GMT)	μkat/l	Kinetická metoda s gama glutamyl – 3-karboxy-4-nitroanilidem, Cobas Integra, Roche Diagnostics	M: 0,17-1,1 Ž: 0,08-0,65
Kreatinin	mmol/l	Kinetická Jaffého kompenzovaná metoda, Cobas Integra, Roche Diagnostics	M: 62-106 Ž: 44-80
Urea	mmol/l	Kinetická metoda s ureázou a gutamátdehydrogenázou, Cobas Integra, Roche Diagnostics	M: 2,5-8,3 Ž: 2,0-6,9
Kyselina močová	μmol/l	Enzymatická kolorimetrická metoda s urikázou, Cobas Integra, Roche Diagnostics	M: 200-420 Ž: 140-340
Amyláza (AMS)	μkat/l	Fotometrická metoda s ethylden G7 PNP, Cobas Integra, Roche Diagnostics	0,47-1,7
TSH	mIU/l	Elektrochemiluminiscence, Elecsys 2010, Hitachi-Boehringer Mannheim, Germany	0,27-4,2
Volný T3	pmol/l	Elektrochemiluminiscence, Elecsys 2010, Hitachi-Boehringer Mannheim, Germany	4,0-7,8
Volný T4	pmol/l	Elektrochemiluminiscence, Elecsys 2010, Hitachi-Boehringer Mannheim, Germany	13,0-23,0
Růstový hormon (STH)	mIU/l	IRMA, Immunotech	0-20
IGFI	ng/ml	IRMA, Immunotech	

Parametr	Jednotky	Metoda stanovení	Norma EÚ
Leptin	ng/ml	RIA, LINCO research	M: 2,0-5,6 Ž: 3,7-11,1
Adiponektin	ng/ml	ELISA, LINCO research	
Ghrelin	pg/ml	RIA, LINCO research	
Kortizol	nmol/l	RIA, vlastní metoda	135-607
Testosteron	nmol/l	RIA, vlastní metoda	M: 4,58-35,4 Ž: 0,4-3,0
SHBG	nmol/l	IRMA, Immunotech	M: 23-66 Ž: 43,2-95
DHEA-S	μmol/l	RIA, Immunotech	M: 0,25-16,1 Ž: 0,09-14,5 (s věkem klesá)
DHEA	nmol/l	RIA, Immunotech	M: záv. na věku Ž: záv. na věku
Androstendion	nmol/l	RIA, vlastní metoda	M: 1,75-8,6 Ž: 1,5-5,4
Lutropin	U/l	RIA, Immunotech	M: 0,5-10,0 Ž: záv. na cyklu
Folotropin	U/l	RIA, Immunotech	M: 2,0-10,0 Ž: záv. na cyklu
AntiGAD	U/ml	RIA, Cis-BIO	negat.
AntiIA2	U/ml	RIA, Medipan, Germany,	negat.

* LDL-cholesterol = celkový cholesterol – (triacylglyceroly/2,2) – HDL-cholesterol

Tab. 2 Plazmatické parametry stanovované po nočním lačnění

Parametr	Jednotky	Metoda stanovení	Norma EÚ
Volné mastné kyseliny- celkové	mmol/l	Enzymatická kolorimetrická metoda ACS-ACOD, NEFA-C, WAKO, Vitalab Eclipse	0,1-0,6
Adrenalin	nmol/l	HPLC	0,1-0,8
Noradrenalin	nmol/l	HPLC	1,2-3,4
Glukagon	pmol/l	RIA, IBL	< 60

Tab. 3 Parametry sledované během OGTT

0 minut	30 minut	60 minut	90 minut	120 minut	150 minut	180 minut
glykémie	glykémie	glykémie	glykémie	glykémie	glykémie	glykémie
C-peptid	C-peptid	C-peptid	C-peptid	C-peptid	C-peptid	C-peptid
inzulín	inzulín	inzulín	inzulín	inzulín	inzulín	inzulín
proinzulín		proinzulín				proinzulín
glukagon		glukagon				glukagon
STH		STH		STH		

Pro genetické studie bylo potřeba co nejlépe charakterizovat inzulínovou senzitivitu a funkci beta-buněk pankreatu. Byla proto stanovena a zhodnocena řada parametrů, zejména odvozených od lačných či stimulovaných hodnot glykémie a inzulínémie, popisujících inzulínovou senzitivitu a funkci beta-buněk (Tab. 4). Počítány byly i dispoziční indexy (DI = index inzulínové senzitivity * index funkce beta-buněk).

Tab. 4 Použité indexy k hodnocení inzulínové senzitivity a funkce beta-buněk odvozené z lačných či stimulovaných hodnot glykémie a inzulínémie (oGTT, ITT)

Index	Vzorec
Funkce β-buněk	
HOMA-F (mIU/mmol)	$20 \times I_0 / (G_0 - 3.5)$
Insulinogenic index $\Delta I / \Delta G_{30}$ (mIU/mmol)	$(I_{30} - I_0) / (G_{30} - G_0)$
Inzulínová rezistence	
HOMA-R (mIU.mmol.l ⁻²)	$I_0 \times G_0 / 22.5$
FIRI (mIU.mmol.l ⁻²)	$I_0 \times G_0 / 25$
Suma I (mIU/l)	$I_0 + I_{60} + I_{120}$
Inzulínová senzitivita	
FGIR (mg/10 ⁻⁴ IU)	G_0 / I_0
Matsuda index (mmol ⁻¹ .mIU ⁻¹ .l ²)	$10^4 / \sqrt{(\text{mean } I \times \text{mean } G \times G_0 \times I_0)}$
AUC-G/AUC-I	AUC-G/AUC-I
Dispoziční index	funkce β-buněk x inzulínová senzitivita

3.3. Metody DNA analýzy

Základním předpokladem genetického výzkumu je kvalitní DNA banka. Vyizolované vzorky DNA byly podrobovány genetické analýze pomocí molekulárně genetických metod DNA analýzy (PCR, RFLP, SSCP), jejichž principy a konkrétní postupy uvádím:

3.3.1. Izolace DNA

Genomická DNA byla izolována z leukocytů nesrážlivé periferní krve (10 ml plné krve s 5 mmol/l K₂-EDTA) fenol-chloroformovou metodou, precipitována ethanolem a rozpuštěna v TE pufru. Později byl používán kit pro izolace DNA z krve (NucleoSpin Blood kit, Macherey-Nagel, Germany). Po změření koncentrace a ověření čistoty (poměr absorbancí DNA 260 nm/proteiny 280 nm) byly roztoky DNA naředěny na pracovní koncentraci 10ng/μl a použity pro PCR amplifikace.

3.3.2. PCR amplifikace (Polymerase Chain Reaction)

Genomická DNA byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce, PCR. Sekvence navržených primerů použitých k amplifikaci a optimalizované reakční podmínky jsou následující:

Polymorfismus Pro12Ala genu *PPARgamma2*

- Sekvence používaných primerů:
forward primer 5'-GCCAATTCAAGCCCAGTC-3'
reverse primer 5'-CGTCCCCAATAGCCGTATC-3'
(Hamann et al. 1999)
- Amplifikační podmínky: Segment se sledovaným polymorfismem Pro12Ala byl amplifikován metodou PCR v objemu 12 µl, s obsahem 20 ng genomické DNA, 0,3 µM každého z obou primerů, 2 mM MgCl₂ (Perkin Elmer), 0,2 mM dNTPs (Fermentas), 10x PCR Buffer dodávaný spolu s Taq DNA polymerázou (AmpliTaq Gold 5U/µl, Perkin Elmer); použito bylo 0,15 U enzymu. Podmínky PCR reakce byly následující: denaturace v 95°C po dobu 12 min., následovalo 35 cyklů denaturace po 20 s, annealingu v 62°C po 30 s, extenze v 72°C 1 min. a konečná extenze v 72°C 10 min.

Mutace Pro113Gln genu *PPARgamma2*

- Sekvence používaných primerů:
forward primer 5'-AATCAAAGTGGAGCCTGCATGT-3'
reverse primer 5'-ATCTCCACAGACACGACATT-3'
(Hamann et al. 1999)
- Amplifikační podmínky: Segment se sledovanou mutací Pro113Gln byl amplifikován metodou PCR v objemu 12 µl, s obsahem 20 ng genomické DNA, 0,3 µM každého z obou primerů, 2,5 mM MgCl₂ (Perkin Elmer), 0,2 mM dNTPs (Fermentas), 10x PCR Buffer dodávaný spolu s Taq DNA polymerázou (AmpliTaq Gold 5 U/µl, Perkin Elmer); použito bylo 0,15 U enzymu. Podmínky PCR reakce byly následující: denaturace v 95°C po dobu 12 min., následovalo 35 cyklů denaturace po 20 s, annealingu v 62°C po 30 s, extenze v 72°C po 1 min. a konečná extenze v 72°C po dobu 10 min. Čistota PCR produktů byla ověřována elektroforeticky na 1,5%

agarózovém gelu (Tris-borát-EDTA). Gel byl obarven ethidiumbromidem a analyzován pod UV světlem.

Polymorfismus A-3826G genu *UCPI*

- Sekvence používaných primerů:
forward primer 5'-CCA GTG GTG GCT AAT GAG AGAA-3'
reverse primer 5'-GCA CAA AGA AGA AGC AGA GAGG-3'
(Valve et al. 1998).
- Amplifikační podmínky: Segment se sledovaným polymorfismem A-3826G byl amplifikován metodou PCR v objemu 12 µl, s obsahem 20 ng genomické DNA, 0,3 µM každého z obou primerů, 2,5 mM MgCl₂ (Perkin Elmer), 0,2 mM dNTPs (Fermentas), 10x PCR Buffer dodávaný spolu s Taq DNA polymerázou (AmpliTaq Gold 5 U/µl, Perkin Elmer); použito bylo 0,15 U enzymu. Podmínky PCR reakce byly následující: denaturace v 95°C po dobu 12 min., následovalo 35 cyklů denaturace po 20 s, annealingu v 62°C po 30 s, extenze v 72°C po 1 min. a konečná extenze v 72°C po dobu 10 min. Čistota PCR produktů byla ověřována elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu (Tris-borát-EDTA). Gel byl obarven ethidiumbromidem a analyzován pod UV světlem.

Polymorfismus E23K genu *KCNJ11*

- Sekvence používaných primerů:
forward primer 5'-GAC TCT GCA GTG AGG CCC TA-3'
reverse primer 5'-ACG TTG CAG TTG CCT TTC TT-3'
(Nielsen et al. 2003).
- Amplifikační podmínky: Segment se sledovaným polymorfismem E23K byl amplifikován metodou PCR v objemu 12 µl, s obsahem 20 ng genomické DNA, 0,3 µM každého z obou primerů, 2,5 mM MgCl₂ (Perkin Elmer), 0,2 mM dNTPs (Fermentas), 10x PCR Buffer dodávaný spolu s Taq DNA polymerázou (AmpliTaq Gold 5U/µl, Perkin Elmer); použito bylo 0,15 U enzymu. Podmínky PCR reakce byly následující: denaturace v 95°C po dobu 12 min., následovalo 35 cyklů denaturace po 20 s, annealingu v 62°C po 30 s, extenze v 72°C po 1 min. a konečná extenze v 72°C po dobu 10 min. Čistota PCR produktů byla ověřována elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu (Tris-borát-EDTA). Gel byl obarven ethidiumbromidem a analyzován pod UV světlem.

3.3.3. RFLP analýza (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Tato technika je založena na schopnosti vysoce specifických enzymů - restričních endonukleáz izolovaných z bakteriálních kmenů - rozeznávat zcela konkrétní 4-8 nukleotidové sekvence v DNA a jejich schopnosti v přesně určeném místě tyto sekvence rozštěpit. Detekce restričních polymorfismů a patogenních mutací měnících cílová místa pro restriktázy se provádí tak, že se amplifikovaný produkt PCR štěpí specifickou restriční endonukleázou. Poté se vzorek aplikuje na gel a provede se elektroforéza. Výsledek štěpení je odečítán po obarvení ethidiumbromidem v UV světle. Z počtu proužků je zřejmé, zda došlo ke štěpení zkoumaného PCR produktu.

Detekce polymorfismu Pro12Ala genu *PPARGgamma2*

Amplifikovaný produkt PCR vymezený primery zahrnuje restriční místo pro endonukleázu HgaI. Restriční reakce probíhala v 37°C za použití 3 U enzymu. V případě nahrazení prolinu alaninem vznikne pro endonukleázu HgaI restriční místo. Výskyt běžného prolinu v kodónu 12 představuje pouze jeden fragment o délce 306 bp, zatímco alanin vede ke štěpení a vzniku dvou fragmentů o délce 220 a 86 bp.

Detekce mutace Pro113Gln genu *PPARGgamma2*

Pomocí PCR byla amplifikována oblast DNA vymezena primery, která zahrnuje restriční místo pro endonukleázu HincII. Restriční reakce probíhala v 37°C za použití 2 U enzymu. V případě nahrazení běžného prolinu glutaminem by došlo k vytvoření restričního místa. Výskyt prolinu v kodónu 113 znamená jediný 118 bp dlouhý fragment, zatímco glutamin by vedl ke štěpení tohoto fragmentu na dva o délce 96 a 22 bp.

Detekce polymorfismu A-3826G genu *UCP1*

Při detekci polymorfismu metodou RFLP se pomocí PCR amplifikovala oblast DNA, která zahrnuje restriční místo pro endonukleázu BclI. Restriční reakce probíhala po dobu 5h v 55°C za použití 5 U enzymu. Nahrazení alaninu guaninem vede ke zrušení restričního místa endonukleázy BclI. Alela A vede ke vzniku dvou fragmentů o délce 157 a 122 bp. Alela G zachovává původní délku PCR produktu, tj. 279 bp.

Detekce polymorfismu E23K genu *KCNJ11*

Prostřednictvím reakce PCR byla amplifikována primery vymezená oblast DNA, která zahrnuje restriční místo pro endonukleázu BanII. Restriční reakce probíhala v 37°C za

použití 3 U enzymu. Nahrazení glutaminu (23E) lysinem (23K) vede ke zrušení restrikčního místa endonukleázy. Amplifikovaný úsek zahrnuje jedno konstantně přítomné restrikční místo mimo sledovaný polymorfismus. Proto nezávisle na aminokyselině v kodónu 23 vždy vznikají dva fragmenty o délce 178 a 32 bp. V případě výskytu majoritní alely genu 23E se fragment dlouhý 178 bp dále štěpí na dva o délce 150 a 28 bp. Je-li přítomna minoritní alela 23K, fragment o délce 178 bp se dále neštěpí.

3.3.4. SSCP analýza (Single Strand Chain Polymorphism)

Jednovláknový konformační polymorfismus, SSCP, je jednoduchou, velice senzitivní a efektivní technikou k detekci mutací typu záměny jedné baze. Metoda je založena na principu různé rychlosti migrace jednovláknových molekul DNA, které se liší svou sekundární strukturou (konformací) v nedenačném polyakrylamidovém gelu (5%). Unikátní konformace jednovláknových fragmentů DNA, které vzniknou po tepelné denaturaci PCR produktů, je dána intramolekulárními interakcemi uvnitř DNA sekvence. Tato konformace je závislá na teplotě a iontové síle. Teplota při elektroforéze je klíčovým parametrem, který ovlivňuje kvalitu rozlišení DNA proužků. Proto byla SSCP analýza teplotně optimalizována pro konkrétní zkoumaný genetický lokus, jímž byl polymorfismus Pro12Ala genu *PPARGgamma2*. Metoda SSCP byla u tohoto polymorfismu použita v těch případech, kdy metoda RFLP neumožnila naprostou jistotu v odečtení výsledků. Tato vysoce citlivá technika zachycuje 100% mutací v DNA fragmentech menších než 200 bp a 80% mutací v DNA fragmentech menších než 400 bp (Hayashi and Yandell 1993).

Pro metodu SSCP byl používán přístroj ALFexpres II (Amersham Pharmacia Biotech), chlazení a udržování konstantní teploty (v daném případě 30°C) zajišťovala přídatná externí chladicí jednotka (Amersham Biosciences). Primery byly značeny fluorescenční značkou Cy5 a jejich sekvence byla následující:

forward primer 5'-Cy5-GAC AAA ATA TCA GTG TGA ATT ACA GC-3'

reverse primer 5'-Cy5-CCC AAT AGC CGT ATC TGG AAG G-3'

(Valve et al 1999).

3.4. Zpracování dat

3.4.1. Databáze Access

Vzhledem ke značnému množství dat bylo rozhodnuto o tvorbě počítačové databáze v programu Access (Microsoft Office 2000), která umožňuje jednotné ukládání dat, minimalizaci chyb, snadné výběry dat a převod dat do formátů vhodných pro statistické zpracování. Bylo nutné dobře promyslet strukturu a logiku této databáze a její provázanost, vlastní naprogramování provedl ing. M. Kasík.

3.4.2 Statistické metody

Jednotlivé studie zpracované v příložených publikacích vyžadovaly specifické statistické zpracování, které je popsáno v příslušné části každé publikace. Obecně lze použité statistické přístupy shrnout do následujících bodů:

• Frekvenční tabulky

Četnosti výskytu různých genotypových konfigurací pro jednotlivé polymorfismy byly porovnávány mezi diabetiky, potomky diabetiků, souborem obézních jedinců, popř. též souborem pacientek s PCOS, a mezi souborem kontrolním. Srovnání je založeno na příslušné kontingenční tabulce a Chí-kvadrát testu s Yatesovou korekcí.

• Neparametrické metody

Užitím robustního neparametrického Mann-Whitneyova testu bylo zjišťováno, zda se od sebe statisticky významně liší nositelé různých genotypů jednotlivých polymorfismů v antropometrických nebo biochemických parametrech v rámci daných souborů.

Každý hodnocený soubor byl rozdělen do tří skupin v závislosti na genotypové konfiguraci sledovaného polymorfismu. Tyto skupiny byly poté mezi sebou srovnávány. Tam, kde to hodnocený parametr vyžaduje, byli odděleně hodnoceni muži a ženy.

• Parametrické metody

V případech, kdy charakter hodnocených parametrů vyžadoval adjustace dat například na věk, pohlaví, BMI či délku trvání DM2, byla distribuce dat normalizována (logaritmičká či mocninná transformace). Vlastní testování bylo provedeno metodou analýzy kovariance (ANCOVA).

Používány byly programy NCSS 2001 a NCSS 2004 (Statistical Solutions, Saugus, MA, USA), QC Expert a Statgraphics-plus (Manugistics, Rockwille, MA, USA).

4. DODATEK K PŘILOŽENÝM PUBLIKACÍM

4.1. Mutace Pro113Gln genu *PPARgamma2*

V úvodní části dizertační práce byla popsána vzácná mutace ve 113. kodónu 6. exonu genu *PPARgamma2*, Pro113Gln. Přítomnost aminokyseliny glutaminu v této pozici vede k těžké obezitě a dalším metabolickým komplikacím. Podrobněji se mutací a jejím dopadem na metabolické procesy zabývá přehledový článek – viz PUBLIKACE 6: **Šrámková et al. Gen PPAR gamma ve středu zájmu obezitologů a diabetologů. DMEV 2001, 4(4): 278-286.**

Během praktického zpracovávání dizertační práce probíhala genotypizace této mutace u jedinců, jejichž BMI překročilo hodnotu 30 kg/m². Během šestileté práce se však nepodařilo zachytit žádného nositele glutaminu ve 113. kodónu genu.

4.2. Polymorfismus E23K genu *KCNJ11*

V příložené publikaci – viz PUBLIKACE 1: **Vejražková et al. Dva nadějně kandidátní geny v etiopatogenezi DM2 - *PPARγ2* a *KCNJ11*. Cas Lek Cesk. 2005;144(11):721-5** jsou zmíněny závěry asociační studie provedené v Endokrinologickém ústavu zabývající se vztahem polymorfismu E23K genu *KCNJ11* k inzulínové senzitivitě. Jak již bylo uvedeno v úvodní části dizertační práce a podrobně rozvedeno v přehledové publikaci – viz PUBLIKACE 9: **Šrámková et al.: Alterované draselné kanály beta buněk a jejich role v patogenezi diabetes mellitus 2. typu. DMEV 2005, ročník 8, číslo 1:18-22**, gen *KCNJ11* se přímo uplatňuje v inzulínové sekreci. Proto byl výzkum proveden na souborech diabetiků, přímých potomků diabetiků a na kontrolních zdravých jedincích. Studie zatím nebyla publikována, uvádím proto její hlavní závěry:

Soubory:

Soubor diabetiků 2. typu tvořilo 293 pacientů (věk 58,67±7,10 let; BMI=30,55±5,52 kg/m²), soubor přímých potomků diabetiků 2. typu byl tvořen 108 jedinci (věk 37,91±10,54 let; BMI=25,35±4,24 kg/m²) a kontrolní soubor 177 jedinci (věk 32,31±10,61 let; BMI=23,31±3,67 kg/m²).

Výsledky:

Genotypová distribuce v kontrolní skupině se významně odlišovala od distribuce ve skupině potomků diabetiků (p=0,03). Genotypové frekvence ve skupině diabetiků se od

kontrol významně nelišily (Tab. 5). Frekvence alely 23K se významně nelišila mezi skupinami diabetiků, potomků diabetiků a kontrolní skupinou (Tab. 6).

Tab. 5 Frekvenční zastoupení genotypů - polymorfismus E23K genu *KCNJ11*

Genotyp	Diabetici 2. typu A=293		Potomci diabetiků A=108		Kontroly n=177	
	A	%	A	%	n	%
EE	107	36,5	34	31,5	71	40,1
EK	148	50,5	61	56,5	72	40,7
KK	38	13,0	13	12,0	34	19,2

Skupiny mezi sebou ($\chi^2=8,13$; df 4; p=0,087)

Diabetici vs. kontroly ($\chi^2=5,46$; df 2; p=0,065)

Potomci diabetiků vs. kontroly ($\chi^2=7,04$; df 2; p=0,03)

Tab. 6 Percentuální zastoupení alel E a K

Alela	Diabetici 2. typu	Potomci diabetiků	Kontroly
E	61,8%	59,7%	60,5%
K	38,2%	40,3%	39,6%

Skupiny mezi sebou ($\chi^2=0,84*10^{-1}$; df 2; p=0,959)

Stanovené glykémie a koncentrace inzulínu v séru během OGTT ani vypočtené indexy odrážející funkci beta-buněk u skupiny potomků diabetiků nesvědčí o snížené sekreci inzulínu u nositelů EK ani KK genotypu. Nositelé genotypu KK v kontrolní skupině měli ovšem ve srovnání s nositeli genotypu EE významně vyšší stimulované hladiny glukózy (G_{30} : p=0,001; G_{60} : p=0,001; G_{90} : p=0,003), nižší inzulínogenní index ($I_{30}-I_0/G_{30}-G_0$: p=0,012) a nižší dispoziční indexy ($I_{30}-I_0/G_{30}-G_0*$ Matsuda: p=0,001; $I_{30}-I_0/G_{30}-G_0/$ sumaIRI₀₋₁₈₀: p=0,013; $I_{30}-I_0/G_{30}-G_0/AUC_{ITT}$: p=0,011). V žádné ze skupin nebyly pozorovány rozdíly mezi genotypy pokud jde o lipidový metabolismus, thyroideální či steroidní hormony ani ve složení těla.

Závěr:

Asociace polymorfismu E23K genu *KCNJ11* s DM2 nebyla sice ve studii potvrzena, nicméně u homozygotních nositelů alely 23K v souboru zdravých dospělých jedinců bez rodinné anamnézy DM2 bylo pozorováno významné snížení inzulínogenního indexu a dispozičních indexů odrážejících funkci beta-buněk pankreatu.

5. SOUHRN

Stanovené cíle dizertační práce byly splněny:

Byl kompletován a podrobně biochemicky a antropometricky charakterizován rozsáhlý soubor diabetiků 2. typu, potomků diabetiků, obézních jedinců, pacientek se syndromem polycystických ovarií a soubor kontrolních jedinců.

Pro potřeby genetického výzkumu byly zavedeny a optimalizovány metody PCR, RFLP a SSCP.

Byly genotypovány polymorfismy vybraných kandidátních genů a byla tak získána prioritní data týkající se frekvencí těchto polymorfismů v české populaci.

Genetická, biochemická a antropometrická data studovaných souborů byla podrobena statistickému rozboru. Hlavní pozornost byla věnována testování případných asociací zjištěných klinických a antropometrických dat se zvolenými genetickými polymorfismy, popř. se sledovanými adipokiny.

Získané výsledky byly posuzovány z hlediska možného vlivu kandidátních genů resp. sledovaných hormonů na tělesné složení a biochemické parametry, byla posuzována jejich případná souvislost s rozvojem diabetu 2. typu a jeho komplikací a s jednotlivými symptomy metabolického syndromu, popř. se syndromem PCOS. Hlavní závěry výzkumu byly publikovány v odborných časopisech a tyto publikace jsou stěžejní částí dizertační práce.

Během šestiletého praktického zpracovávání dizertační práce byla učiněna zajímavá zjištění popisující vztahy vybraných adipokinů k dalším metabolickým markerům, u adipokinu leptinu byla sledována též jeho reakce na výraznou změnu energetické bilance. Dále byly nalezeny některé asociace polymorfismů v kandidátních genech *PPARGgamma2*, *UCP1* a *KCNJ11* s antropometrickými a klinicko-biochemickými parametry. Ze závěrů studií vyplývá, že studované polymorfismy mají na patogenezi DM2, obezity a metabolického syndromu u české populace minoritní podíl. Takové zjištění je u multifaktoriálních chorob, kterými diabetes, obezita i metabolický syndrom jsou, příspěvkem přibližujícím ke konečnému cíli očekávaného od studia této problematiky: jak již bylo v úvodu předesláno, výzkum multifaktoriálních onemocnění, na jejichž rozvoji se podílí jak vnější prostředí, tak i genetické pozadí, vyžaduje dlouhodobou trpělivou práci, během níž se pod pojmem „genetické pozadí“ postupně odkrývají desítky a stovky genů a v jejich rámci další desítky a stovky genetických polymorfismů. Efekt jednotlivých genů a genetických variant na sledované markery energetického metabolismu přitom může být malý, statisticky průkazný až na velmi početných souborech vyšetřovaných jedinců. Přesto je mapování genetických

faktorů, podílejících se na rozvoji onemocnění tak rozšířených, že v současnosti nesou označení „civilizační choroby“, nezbytným předpokladem pro vývoj a aplikaci co nejefektivnější a co nejpřesněji zacílené léčby těchto onemocnění (tzv. farmakogenomika). Důkladné zmapování predispozičních genetických markerů též zvyšuje možnosti účinné prevence, neboť významně posiluje motivaci informovaných disponovaných jedinců dodržovat doporučená režimová opatření.

6. PUBLIKACE KOMENTOVANÉ V DIZERTAČNÍ PRÁCI

1. **Vejražková D**, Bendlová B. Dva nadějně kandidátní geny v etiopatogenezi DM2 - PPAR γ 2 a KCNJ11. *Cas Lek Cesk.* 2005;144(11):721-725.
2. **Šrámková D.**, Šrajer J., Bláha P. Korelace leptinu s antropometrickými parametry během redukční léčby obézních dětí. *Sborn. lék.* 2002;103(4):487-494.
3. Vrbikova J, Dvorakova K, Hill M, Vcelak J, Stanicka S, Vankova M, **Sramkova D**, Vondra K, Bendlova B, Starka L. Determinants of circulating adiponectin in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Invest.* 2005;60(3):155-161. **IF= 0.810**
4. **Šrámková D**, Bendlová B. Rezistin-klíč k inzulinové rezistenci? *DMEV* 2002; 5(4): 225-228.
5. Vrbikova J, Vondra K, Cibula D, Dvorakova K, Stanicka S, **Sramkova D**, Sindelka G, Hill M, Bendlova B, Skrha J. Metabolic syndrome in young Czech women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2005 Dec;20(12):3328-3332. **IF=3.669**
6. **Šrámková D.**, Bendlová B., Kunešová M., Hainer V. Gen PPAR γ ve středu zájmu obezitologů a diabetologů. *DMEV* 2001;4(4):278-286.
7. **Šrámková D.**, Kunešová M., Hainer V., Hill M., Včelák J., Bendlová B. Is a Pro12Ala polymorphism of the PPAR γ 2 gene related to obesity and type 2 diabetes mellitus in the Czech population? *Ann N Y Acad Sci* 2002;967:265-273. **IF=1.971**
8. **Sramkova D**, Krejbichova S, Vcelak J, Vankova M, Samalikova P, Hill M, Kvasnickova H, Dvorakova K, Vondra K, Hainer V, Bendlova B. The UCP1 Gene Polymorphism A-3826G in Relation to DM2 and Body Composition in Czech Population“ *ECED* 2007; Issue 2 – v tisku. **IF=1.367**
9. **Šrámková D**, Bendlová B. Alterované draselné kanály beta buněk a jejich role v patogenezi diabetes mellitus 2. typu. *DMEV* 2005;8(1):18-22.