

PUBLIKACE 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.

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Dva nadějně kandidátní geny v etiopatogenezi DM2 - PPAR γ 2 a KCNJ11Vejražková D., Bendlová B.
Endokrinologický ústav, Praha

SOUHRN

Diabetes mellitus 2. typu (DM2) je heterogenní onemocnění, na jehož rozvoji se podílejí genetické faktory i vnější prostředí. Přes značné úsilí, které je mapování genetického pozadí DM2 věnováno, nejsou genetické příčiny nejběžnějších forem diabetu objasněny. V posledních letech je věnována velká pozornost dvěma kandidátním genům, u nichž jsou opakovaně popisované asociace s DM2. Jde o gen PPAR γ 2 (peroxisome proliferator-activated receptor) a KCNJ11 (potassium channel inwardly rectifying). Rodina jaderných receptorů, známých jako receptory aktivované peroxizómovými proliferátory, hraje důležitou úlohu v regulaci energetického metabolismu a adipogeneze. Gen KCNJ11 kóduje podjednotku draselných kanálů pankreatických beta buněk. Tyto kanály se přímo účastní regulace inzulínové sekrece. Práce shrnuje současné poznatky o zapojení těchto genů a jejich polymorfizmů do složitých metabolických dějů, zvláštní pozornost je věnována metabolismu glycidovému.

Klíčová slova: diabetes mellitus 2. typu, inzulínová rezistence, gen PPAR γ 2, gen KCNJ11, genetický polymorfismus, glukózový metabolismus.

SUMMARY

Vejražková D., Bendlová B.: Two Promising Candidate Genes in the Etiopathogenesis of DM2 - PPAR γ 2 and KCNJ11

Type 2 DM represents a multifactorial disease – both genetic and environmental factors are implicated in the etiology. In spite of an enormous effort, unraveling the genetics of type 2 DM has proved problematic. A polygenic inheritance is proposed for most cases. More than 250 candidate genes have been studied and increasing attention is being directed at two of them: the PPAR γ 2 gene (peroxisome proliferator-activated receptor gamma2) and KCNJ11 (potassium channel inwardly rectifying). The PPAR γ 2 is a member of the nuclear hormone receptor subfamily of transcription factors. It plays a key role in regulation of adipocyte differentiation and energy balance. The KCNJ11 gene codes for a pore-forming subunit of the inwardly rectifying ATP sensitive K⁺ channel, which is involved in the direct regulation of insulin secretion. Here, recent knowledge regarding involvement of these two genes in complex metabolic pathways is summarized. In the whole review, we focus on the glucose homeostasis.

Key words: type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, PPAR γ 2 gene, KCNJ11 gene, genetic polymorphism, glucose balance. *Ve.*

Čas. Lék. čes., 2005, 144, s. 721–725.

Diabetes mellitus 2. typu (DM2) patří k nejrozšířenějším civilizačním chorobám, v západních státech postihuje okolo 3-5 % populace. Výskyt stoupá s věkem a se vzrůstajícím počtem obézních lidí. Jde o heterogenní onemocnění, na jehož rozvoji se podílejí genetické faktory i vnější prostředí. Genetické studie DM2 se v současné době zaměřují na identifikaci tzv. kandidátních genů, které ovlivňují predispozici jednotlivce k DM2. Jakmile je vybrán kandidátní gen, jsou hledány jeho genetické varianty, často jednonukleotidové polymorfizmy. I když již bylo ve vztahu k DM2 studováno více než 250 kandidátních genů, výsledky nejsou zatím příliš povzbudivé. Opakovaně však byla potvrzena asociace DM2 s polymorfizmy dvou genů. Jde o gen PPAR γ 2, který je transkripčním faktorem s přímým vlivem na diferenciaci adipocytů, a gen KCNJ11, který kóduje jednu z buněčných struktur nepostradatelnou pro správnou regulaci inzulínové sekrece, tzv. Kir6.2 podjednotku draselných kanálů pankreatických beta buněk.

RODINA JADERNÝCH RECEPTORŮ
OZNAČOVANÝCH JAKO PPAR γ

PPARs jsou obecné transkripční faktory nepostradatelné pro regulaci buněčného cyklu, uplatňují se v zánětlivém procesu a v řízení imunitní odpovědi (1), v karcinogenezi (2) a v aterogenezi (3). Zájem diabetologů a obezitologů vzbudilo zejména zjištění, že PPAR γ hraje klíčovou roli v adipogenezi a dále že mezi jeho syntetické ligandy patří thiazolidindiony (4), látky stále hojněji využívané ke zlepšení citlivosti na inzulín u diabetiků 2. typu.

KLASIFIKACE GENŮ PPAR γ RODINY

Známý jsou tři typy PPARs: α , β (znám též pod názvem δ) a γ , každý je kódován na jiném chromozómu lidského genomu.

Gen pro PPAR α je umístěn v na 22. chromozómu v oblasti 22q13.31. U člověka je exprimován převážně v hnědé tukové tkáni a játrech, dále v ledvinách, srdci a kosterním svalstvu. Cílovými

geny PPAR α jsou geny účastníci se lipidového katabolizmu, tj. transportu mastných kyselin do buněk, jejich oxidace v mikrozómech, peroxizómech a mitochondriích.

Gen pro PPAR β je lokalizován na 6. chromozómu v oblasti 6p21.2–p21.1. Exprimován je u člověka nejhojněji v tlustém střevě a placentě, dále v ledvinách a srdci. Ovlivňuje expresi acetyl-CoA syntázy 2 v mozku, je zapojen do procesu embryonální implantace a decidualizace, je prokázán vztah k rakovině tlustého střeva.

Gen pro PPAR γ byl lokalizován na 3. chromozómu v oblasti 3p25 (5, 6). Existují jeho 4 formy: PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR γ 3 a PPAR γ 4. Všechny vznikají alternativním sestřihem a jsou řízeny různými promotory. Gen pro PPAR γ 1 je exprimován v mnoha různých tkáních (tuková tkáň, slabě též v kostní dřeni, slezině, ledvinách, játrech, testes, mozku, srdci, kosterních svalech). Gen pro PPAR γ 2 je exprimován především v tukové tkáni. Gen pro PPAR γ 3 je podle dosavadních znalostí exprimován v tlustém střevě a tukové tkáni. O tkáňové distribuci exprese genu pro PPAR γ 4 není v současné době zatím mnoho známo (7).

PPAR γ je aktivátorem buněčné diferenciace adipocytů. Ve spojení s transkripčními faktory indukuje diferenciaci pre-adipocytů ve zralé tukové buňky (8–11). Účinek je zprostředkován geny aktivními v tukové tkáni. K nim patří geny pro proteiny uplatňujícími se v regulaci množství zásobního tuku a v přenosu signálů ovlivňujících inzulínovou senzitivitu jako např. tumor nekrotizující faktor α (TNF α), lipoproteinová lipáza (LPL), adipocyte fatty acid binding protein 2 (aP2), acetyl-CoA syntáza, fatty acid transport protein (FATP), karnitin palmitoyltransferáza (CPT) nebo fosfoenolpyruvát karboxykináza (PEPCK).

PŮSOBENÍ PPAR γ A LÁTKY, KTERÉ HO MODULUJÍ

PPARs funkčně aktivované některým z ligandů (viz níže) se vážou na specifickou oblast v promotoru cílových genů (tzv. hormone response element) a modulují tak jejich transkripci. PPARs se mohou na promotorovou oblast DNA vázat pouze ve formě heterodimeru s retinovým receptorem X (RXR) (12).

Mezi přirozené ligandy a funkční aktivátory PPARs patří mastné kyseliny a jejich deriváty (leukotrieny, některé prostaglandiny), přičemž polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (např. kyselina linolová) se přednostně vážou na PPAR α . Efektivním funkčním aktivátorem PPAR γ byl shledán prostaglandin 15-dPGJ2. Velmi potentními funkčními aktivátory PPAR γ jsou deriváty produktů oxidace LDL: 9-hydroxy a 13-hydroxy octadecadienové kyseliny (HODE) a 15-hydroxyeicosatetraenová kyselina (15-HETE). I inzulín potencuje u člověka expresi a adipogenní aktivitu PPAR γ 1 i PPAR γ 2. Známa je nepřímá negativní regulace exprese PPAR γ působením prostaglandinu F $_2$ (PGF $_2$) prostřednictvím MAP kináz.

K syntetickým ligandům PPAR, zejména PPAR α , se řadí tzv. fibrátové hypolipidemické léky jako bezafibrát, fenofibrát, gemfibrozil a klobfibrát. K ligandům PPAR γ se spíše slabší afinitou patří tzv. nesteroidní antiinflatorní léky (NSAIDs – nonsteroidal antiinflammatory drugs), např. indomethacin, fenoprofen, ibuprofen, kys. flufenamová). Selektivní afinitu k PPAR γ vykazují tzv. tyrosine-based agonists. Silnou afinitu vykazují antidiabetika thiazolidindionové řady (troglitazon, pioglitazon, rosiglitazon, ciglitazon, englitazon). Vliv thiazolidindionů na PPAR α a β je výrazně slabší. Pozornost zasluhuje poznamenat, že thiazolidindiony stimulují diferenciaci preadipocytů, publikovaný ještě před znalostí souvislosti s PPAR γ (13). V současnosti je známo, že aktivace PPAR γ prostřednictvím thiazolidindionů vyvolává zvýšení počtu malých adipocytů, které jsou v porovnání se staršími tukovými buňkami citlivější na inzulín, přinejmenším hodnotí-li se schopnost glukózového

transportu. Toto zjištění přispívá k pochopení mechanismu účinku thiazolidindionů jako farmak zlepšujících inzulínovou senzitivitu. Stimulace formace nových adipocytů spolu s posílením distribuce mastných kyselin do adipocytů a syntézou triglyceridů (TG) objasňuje i neblahý důsledek, který je popisován při dlouhodobé léčbě některými farmaky z řady thiazolidindionů, a tím je hmotnostní přírůstek (14). Zlepšení citlivosti na endogenní inzulín může být dosaženo též působením agonistů RXR, které s PPAR γ tvoří heterodimery.

POPSANÉ POLYMORFIZMY V GENU PRO PPAR γ 2 A JEJICH ASOCIACE S OBEZITOU A DM2

Protože PPAR γ 2 je transkripčním faktorem s přímým vlivem na diferenciaci adipocytů, bylo zjišťováno, jakou spojitost mají mutace a polymorfizmy v genu pro tento faktor s množstvím zásobního tuku a popřípadě s DM2.

Ve dvou studiích (15, 16) byla nalezena vzácná mutace genu PPAR γ 2 ve 113. kodónu (substituce Pro113Gln, v literatuře často uváděno též jako Pro115Gln). Mutace má za následek zvýšenou aktivitu genu a následné zrychlení diferenciace adipocytů, neboť je znemožněna fosforylace serinu v pozici 112. Právě tato fosforylace vede za normálních okolností k inhibici genové exprese. Mutace byla v heterozygotním stavu popsána u 4 z 358 vyšetřovaných nepříbuzných jedinců německé národnosti. Všichni nositelé byli těžce obézní s body mass indexem (BMI) nad 37,9 kg/m 2 ovšem se zachovanou citlivostí k inzulínu (15). Jeden nositel této mutace byl nalezen ve skupině jedinců s výraznou inzulínovou rezistencí (16), jeho BMI bylo 28,5 kg/m 2 . Širší vliv na prevalenci obezity v evropské populaci však vylučuje extrémní vzácnost mutace.

Běžný je oproti tomu polymorfizmus v pozici 12 (Pro12Ala) exonu B genu PPAR γ 2. Je nalézán ve velmi různém frekvenčním zastoupení v závislosti na etnické příslušnosti testovaných jedinců. U hispánských populací je minoritní alela zastoupena až z 23%, u evropské populace a u Američanů evropského původu asi ve 12%, u mexických Američanů v 10%, u Američanů afrického původu a u Japonců jen ve 2–3 %. Polymorfizmus snižuje transkripční kapacitu genu (17, 18), důsledkem je podle některých studií nižší BMI a vyšší inzulínová senzitivita, v souladu s tím je popisován též snížený výskyt minoritní alely 12Ala mezi diabetiky 2. typu (19, 20). Tato pozorování vycházejí z tzv. asocičních studií. Jedná se o studie, které obecně sledují vztah mezi určitým polymorfizmem a fenotypickými charakteristikami určité skupiny jedinců, vyžadují pro hodnotné statistické zpracování s dostatečnou silou testů početně velmi rozsáhlé soubory. I při splnění tohoto předpokladu nebývají závěry asocičních studií vždy jednoznačné. Liší se například v závislosti na etnické příslušnosti testované populace, ale i v rámci jednoho etnika mohou být mezi studii značné diskrepance. Proto se přistupuje k metaanalýzám. Úskalím metaanalýz je, že pozitivní pozorování, která svědčí o asociaci zkoumaného genetického polymorfizmu s daným onemocněním, mají vyšší publikační atraktivitu a jejich zastoupení v konečném hodnocení metaanalýz proto může být ve srovnání s pozorováními, která asociace nepotvrzují, uměle vyšší (tzv. publikační bias). S vědomím nezbytnosti opatrného přístupu je přesto velmi zajímavý závěr metaanalýzy hodnotící asociaci polymorfizmu Pro12Ala s DM2 (21). Potvrdila s vysokou statistickou významností protektivní vliv alely 12Ala. Vyplývá z ní, že kdyby celá populace byla složena jen z nositelů alely 12Ala, prevalence DM2 by se snížila o 25 %. Mnohé dílčí asociční studie však protektivní vliv minoritní alely ve vztahu k DM2 nepotvrzují. Pokud jde o asociaci polymorfizmu Pro12Ala s obezitou, jsou zajímavé závěry Eka et al. (22), který popisuje vyšší BMI u homozygotních nositelů alely 12Ala mezi 752 obézními muži

evropského původu, avšak mezi kontrolní neobézní skupinou 869 mužů vykazovali homozygotní nositelé alaninu BMI významně nižší. Některé studie asociaci s BMI nepozorovaly vůbec.

Několik dalších polymorfizmů v genu pro PPAR γ 2 (Pro495Leu, Val318Met, Phe388Leu, Arg425Cys) je asociováno s částečnou lipodystrofií, těžkou inzulinovou rezistencí, DM2 a také s hypertenzí.

Na našem pracovišti jsme polymorfizmus Pro12Ala genu PPAR γ 2 testovali u souboru 350 diabetiků 2. typu a 880 nediabetických jedinců. Srovnávali jsme parametry glukózového metabolismu u nositelů a nenositelů alely 12Ala. Vyšší inzulinovou senzitivitu u nositelů alely 12Ala jsme potvrdili pouze v souboru diabetiků.

DRASELNÉ KANÁLY

ATP-senzitivní draselné kanály jsou přítomné v membránách mnoha typů buněk různých tkání, například v buňkách kosterního a srdečního svalu, v hladkých svalech cév, neuronech či v beta buňkách pankreatu. Řadí se k široké skupině membránových iontových kanálů, které koordinují buněčné funkce, jako je neurotransmise, kontrakce či sekrece. Pro všechny iontové kanály je charakteristická neustálá fluktuace mezi otevřeným a zavřeným stavem. Aktuální stav určuje intracelulární či extracelulární koncentrace látek, které otevírání stimulují či inhibují, nebo mohou kanály reagovat na změny membránového potenciálu. ATP-senzitivní draselné kanály beta buněk pankreatu umožňují převod vnitrobuněčných metabolických změn ve změny elektrické aktivity plazmatických membrán buněk a jsou klíčové pro regulaci inzulinové sekrece. Uzavření kanálů je důležitým předpokladem pro spuštění sekrece inzulinu, zatímco jejich otevření vede k inhibici inzulinové sekrece (23).

STRUKTURA A FUNKCE DRASELNÉHO KANÁLU BETA BUNĚK

Draselné kanály v beta buňkách pankreatu jsou komplexy tvořené rozsáhlou regulační částí a vlastním pórem kanálu. Regulační část je složena ze sulfonylureových receptorů (SUR1), pór kanálu sestává z podjednotek nazývaných Kir6.2 (**potassium inward rectifier 6.2**).

Jak SUR1 podjednotky, tak Kir6.2 podjednotky jsou nezbytné pro správnou regulaci metabolické funkce kanálu, pro kterou je stěžejní koncentrace ATP uvnitř buňky (poměr ATP/ADP). Je-li koncentrace ATP nízká, draselné kanály jsou převážně otevřené a umožňují tok draslíku po směru elektrochemického gradientu ven z buňky, membránový potenciál je tak udržován v hyperpolarizovaném stavu. Příjem glukózy a následný vzestup intracelulární koncentrace ATP vede k uzavření kanálu vazbou ATP na Kir6.2 podjednotky, což spouští kaskádu reakcí umožňujících zahájení inzulinové sekrece: Draslík nemůže uzavřenými kanály unikat z buňky, dochází k depolarizaci buněčné membrány, tím jsou otevírány napětově závislé vápníkové kanály a následný vzestup intracelulárního vápníku proudícího po koncentračním spádu do buněk vede k exocytóze inzulinových granúl z beta buněk pankreatu. Sulfonylurea a její deriváty stimulují inzulinovou sekreci vazbou na svůj receptor, tedy na SUR1 podjednotku, což vede k uzavření draselného kanálu a sekreci inzulinu nezávisle na koncentraci ATP v beta buňce (23). Tohoto efektu sulfonylurey a jejích derivátů se využívá při léčbě DM2. Naopak ADP ve vazbě na hořčičnaté ionty (Mg-ADP) také interaguje se SUR1 podjednotkami draselného kanálu, působí však jejich otevření a je tak výrazným inhibitorem inzulinové sekrece.

CHROMOZOMÁLNÍ LOKALIZACE GENŮ PRO DRASELNÝ KANÁL

Gen kódující SUR1 je nazýván ABCC8 (náleží do tzv. ATP-binding cassette rodiny, v jejím rámci do podrodiny C, člen 8), gen kódující Kir6.2 byl pojmenován KCNJ11 (patří do rodiny zvané **potassium channel inwardly rectifying**, podrodiny J, člen 11). Oba leží na krátkém raménku chromozómu 11 (proužek 11p15.1).

POLYMORFIZMY A MUTACE SPOJENÉ SE ZMĚŇENOU FUNKCÍ DRASELNÝCH KANÁLŮ

Jak již bylo uvedeno, pro správnou regulaci funkce draselného kanálu, a tedy i pro vyváženou regulaci sekrece inzulinu je nezbytná bezchybná funkce jak SUR1, tak Kir6.2 podjednotek. Dokladem tohoto tvrzení je vrozená porucha glykoregulace nazvaná perzistentní hyperinzulinemická hypoglykémie dětí (PHHI – persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy). Jde o vzácnou metabolickou poruchu projevující se již u novorozenců těžkými stavy hypoglykémie s neschopností suprese inzulinové sekrece. Postiženou molekulou může být například regulační SUR1 podjednotka kanálu, ale též pór formující podjednotka Kir6.2. Onemocnění mohou navíc způsobit mutace i jiných molekul zapojených do glykoregulačních mechanismů, např. glukokinázy (24), glutamindehydrogenázy (25) a dalších. Ne vždy se podaří odpovědnou mutaci detekovat a najít účinnou terapii, ve vážných případech je třeba pro udržení přijatelného rozmezí hodnot glykémie a ochraně dítěte před mentální retardací přistoupit k částečné či subtotální pankreatomii. S projevy PHHI byly poprvé spojeny mutace v genu pro SUR1 (26–28) a v současné době je známo přes 20 různých substitucí, inzercí a delecí v intronech i exonech tohoto genu s různým stupněm závažnosti onemocnění, od mírných farmakologicky zvládnutelných projevů až po úplnou absenci aktivity draselných kanálů v beta buňkách. V podjednotce Kir6.2 bylo popsáno též několik mutací vedoucích k projevům PHHI (29, 30). Na druhé straně jsou známy mutace a polymorfizmy, které vedou k vyšší aktivitě draselných kanálů v beta buňkách, a tím ve svém důsledku snižují schopnost inzulinové sekrece a mohou být jedním z významných faktorů predisponujících či přímo vedoucích (31) k rozvoji DM2. Takové polymorfizmy budí v posledních letech veliký zájem vědců i lékařů.

POLYMORFIZMUS E23K

K nejčastěji diskutovaným genetickým variantám tohoto typu patří záměna obvyklé kyseliny glutamové ve 23. kodónu genu kódujícím Kir6.2 podjednotku draselného kanálu za lysin. substituce je značena podle jednopísmenných zkratk aminokyselin jako polymorfizmus E23K. Substituce zvyšuje práh koncentrace ATP, který je nutný pro uzavření draselných kanálů, a tím mírně snižuje inzulinovou sekreci (32). Vzhledem k tomu, že minoritní alela K kódující lysin je dosti hojně zastoupena (v závislosti na etnické příslušnosti studované populace přibližně od 30 do 40 %), může i její relativně malý vliv na schopnost inzulinové sekrece představovat pro populaci velkou predispoziční zátěž.

Asociační studie, která zahrnovala 2036 jedinců (33), zkoumala vztah polymorfizmu E23K k DM2. Byla porovnáována četnost minoritní alely a genotypická distribuce mezi skupinou diabetiků 2. typu a kontrolními zdravými jedinci. U diabetiků byla hojněji zastoupena riziková alela K (40 % oproti 36 % v kontrolní skupině) a také genotypické srovnání odhalilo vyšší procento rizikové kombinace alel KK mezi diabetiky (16 % oproti 13 % v kontrolní skupině). U kontrolních jedinců byla naopak ve srovnání s diabetiky

častější protektivní kombinace EE (42 % oproti 36 %). Studie uzavírá, že polymorfismus E23K je asociován s lehce zvýšeným rizikem DM2. I ze studie provedené na našem pracovišti u souboru 400 nediabatických jedinců vyplývá, že genotyp KK je asociován s funkcí beta buněk pankreatu, konkrétně s nižším inzulinogenním indexem. Metaanalytické zpracování studií publikovaných na toto téma vedlo k závěrům, že odhad populační zátěže, jímž polymorfismus E23K přispívá, činí v populaci kavkazského původu 15 % (34). Znamenalo by to, že kdyby v evoluci nedošlo v genu pro Kir6.2 ve 23. kodónu k substituci glutamové kyseliny za lysin a všichni lidé by tedy byli nositeli genotypu EE, bylo by v kavkazské populaci o 15 % diabetiků 2. typu méně. Přes výše zmíněné úskalí metaanalytického přístupu v hodnocení rizikovosti určitého polymorfismu pro dané onemocnění patří v současné době polymorfismus E23K silou své asociace s DM2 k nejvýznamnějším.

Význam mapování genetického pozadí polygenních chorob, jako je DM2 či obezita, spočívá zejména v tom, že odhalení konkrétních polymorfizmů, určení jejich četnosti v populacích různé etnické příslušnosti, postupný odhad jejich rizikovosti pro danou populaci a zejména důkladné poznání jejich funkce ve složité etiopatogenezi skýtá pro postižené jedince, u nichž má na rozvoji onemocnění podíl konkrétní genotyp, naději na velmi přesně zacílenou léčbu. Farmaka by mohla působit přímo na funkci pozměněného genu a výrazně tak snížit závažnost onemocnění s minimálními vedlejšími účinky pro léčeného člověka.

Zkratky

ABC	- ATP-binding cassette
aP2	- adipocyte fatty acid binding protein 2
BMI	- body mass index
CPT	- karnitin palmitoyltransferáza
DM2	- diabetes mellitus 2. typu
FATP	- fatty acid transport protein
HODE	- 9-hydroxy a 13-hydroxy octadekadienová kyselina
15-HETE	- 15-hydroxyeicosatetraenová kyselina
KCNJ	- potassium channel inwardly rectifying
Kir	- potassium inward rectifier
LPL	- lipoproteinová lipáza
NSAIDs	- nesteroidní antiinflatorní léky (nonsteroidal antiinflammatory drugs)
PEPCK	- fosfoenol pyruvát karboxykináza
PHHI	- persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy
PPAR	- peroxisome proliferator-activated receptor
RXR	- retinový receptor X
SUR	- sulfonylureový receptor
TG	- triglyceridy
TNF	- tumor nekrotizující faktor

LITERATURA

1. He, T. Ch., Chan, T. A., Vogelstein, B., Kinzler, K. W.: PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*. 1999, 99, s. 335-345.
2. Sarraf, P., Mueller, E., Smith, W. M. et al.: Loss-of-function mutations in PPAR-gamma associated with human colon cancer. *Molec. Cell*. 1999, 3, s. 799-804.
3. Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G. A. et al.: Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell*. 1998, 93, s. 229-240.
4. Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A. et al.: An anti-diabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* 1995, 270, s. 12953-12956.
5. Greene, M., Blumberg, B., McBride, O. et al.: Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.* 1995, 4, s. 281-299.

6. Beamer, B. A., Negri, C., Yen, C. J. et al.: Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor-gamma (hPPAR-gamma) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 233, s. 756-759.
7. Sundvold, H., Lien, S.: Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor RORalpha1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 287, s. 383-390.
8. Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E. et al.: PPAR-gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and *in vitro*. *Molec. Cell*, 1999, 4, s. 611-617.
9. Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., Spiegelman, B. M.: Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes. Dev.*, 2000, 14, s. 1293-1307.
10. Rosen, E. D., Spiegelman, B. M.: PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol.Chem.* 2001, 276, s. 37731-37734.
11. Saladin, R., Fajas, L., Dana, S. et al.: Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis. *Cell. Growth Differ.* 1999, 10, s. 43-48.
12. Desvergne, B., Wahli, W.: Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 1999, 20, s. 649 až 688.
13. Kletzien, R. F., Clarke, S. D., Ulrich, R. G.: Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol. Pharmacol.* 1992, 41, s. 393-398.
14. Larsen, T. M., Toubro, S., Astrup, A.: PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy? *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 2003, 27, s. 147-161.
15. Ristow, M., Muller-Wieland, D., Pfeiffer, A. et al.: Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N. Engl. J. Med.*, 1998, 339, s. 953-959.
16. Bluher, M., Paschke, R.: Analysis of the relationship between PPAR-gamma 2 gene variants and severe insulin resistance in obese patients with impaired glucose tolerance. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2003, 111, s. 85-90.
17. Deeb, S. S., Fajas, L., Nemoto, M. et al.: A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat. Genet.* 1998, 20, s. 284-287.
18. Masugi, J., Tamori, Y., Mori, H. et al.: Inhibitory effect of a proline-to-alanine substitution at codon 12 of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 on thiazolidinedione-induced adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 268, s. 178-182.
19. Hara, K., Okada, T., Tobe, K. et al.: The Pro 12 Ala Polymorphism in PPAR γ 2 May Confer Resistance to Type 2 Diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 271, s. 212-216.
20. Deeb, S. S., Fajas, L., Nemoto, M. et al.: A Pro 12 Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Genet.* 1998, 20, s. 284-287.
21. Altshuler, D., Hirschhorn, J. N., Klannemark, M. et al.: The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat. Genet.*, 2000, 26, s. 76-80.
22. Ek, J., Urhammer, S. A., Sørensen, T. I. A. et al.: Homozygosity of the Pro 12 Ala variant of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (PPAR- γ 2): divergent modulating effect on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia*, 1999, 42, s. 892-895.
23. Gribble, F. M., Reimann, F.: Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia*, 2003, 46, s. 875-891.
24. Glaser, B., Kesavan, P., Heyman, M. et al.: Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N. Engl. J. Med.* 1998, 338, s. 226-230.
25. Stanley, C. A., Lieu, Y. K., Hsu, B. Y., Poncz, M.: Hypoglycemia in infants with hyperinsulinemia and hyperammonemia: gain of function mutations in the pathway of leucine-mediated insulin secretion. *Diabetes*, 1997, 46, s. 217A.
26. Glaser, B., Chiu, K. C., Anker, R. et al.: Familial hyperinsulinism maps to chromosome 11p14-15.1, 30 cM centromeric to the insulin gene. *Nat. Genet.*, 1994, 7, s. 185-8.

27. Thomas, P. M., Cote, G. J., Hallman, D. M., Mathew, P. M.: Homozygosity mapping to chromosome 11p. of the gene for familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Am. J. Hum. Genet.*, 1995, 56, s. 416-421.
28. Thomas, P. M., Cote, G. J., Wohlk, N. et al.: Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science*, 1995, 268, s. 426-429.
29. Thomas, P., Ye, Y., Lightner, E.: Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum. Mol. Genet.*, 1996, 5, s. 1809-1812.
30. Nestorowicz, A., Inagaki, N., Gono, T. et al.: A nonsense mutation in the inward rectifier potassium channel gene, Kir6.2, is associated with familial hyperinsulinism. *Diabetes*, 1997, 46, s. 1743-1748.
31. Gloyn, A. L., Pearson, E. R., Antcliff, J. F. et al.: Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 350, s. 1838-1849.
32. Schwanstecher, C., Meyer, U., Schwanstecher, M.: K(IR)6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic beta-cell ATP-sensitive K(+) channels. *Diabetes*, 2002, 51, s. 875-879.
33. Gloyn, A. L., Weedon, M. N., Owen, K. R. et al.: Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2003, 52, s. 568-572.
34. Schwanstecher, C., Schwanstecher, M.: Nucleotide sensitivity of pancreatic ATP-sensitive potassium channels and type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002, 51 (Suppl. 3), s. S358-S362.

Práce je podporována grantovými úkoly IGA MZ ČR NR/7809-5 a COST OC B17.10 MŠMT.

KOMENTÁŘ

Komentář k článku autorek J. Vejražkové a B. Bendlové „Dva nadějně kandidátní geny v etiopatogenezi DM2 - PPAR γ 2 a KCNJ11“

Diabetes mellitus 2. typu je onemocnění s velmi zajímavou interakcí genetiky a prostředí. Bez genetické zátěže nemůže toto onemocnění prakticky vzniknout. Kdo má oba rodiče diabetiky 2. typu, dostane diabetes skoro ve 100 %. Druhé monozygotní dvojče dostane cukrovku také skoro určitě. Americké Pima indiány jezdí dnes zkoumat řada odborníků a výskyt diabetes mellitus je u nich skoro 100%. Před sto lety, když je zkoumal český antropolog Aleš Hrdlička, neměli cukrovku asi vůbec, a když je ve 40. letech 20. století zkoumal Joslin, měli jen trochu větší výskyt diabetu než ostatní populace. Podobně i naši předkové netrpěli tolik cukrovkou, dokonce ještě v 70. letech minulého století bylo diabetiků kolem 2 %. Dnes jich je více, než uvádějí autorky – je to 7 %, a to u nás neexistuje celopopulační skrínink diabetu. V jedné skríninkové bavorské studii (a tato populace se stravou určitě neliší a genetikou možná jen trochu liší od nás) byl výskyt diabetu 10 %. Tyto skutečnosti naopak ukazují, že diabetes mellitus je vyvolán prostředím, ale na genetickém základě. Možnost molekulárně genetické detekce osob s rizikem diabetu by byla velmi významná. Geny pro diabetes a metabolický syndrom hledá celý svět.

Cituji z mé dva roky staré knížky *Prevence diabetu* (1): „Molekulárně geneticky byly prokázány 2 oblasti s vazbou na diabetes 2. typu Je to tzv. lokus NIDDM1 na chromozómu 2q shodný s tzv. genem pro calpain-10 a lokus NIDDM 2 na chromozómu 12q, kde není známo o jaký gen se může jednat. Vynecháváme přitom celou oblast MODY diabetu, která s touto statí a s diabetem 2. typu přímo nesouvisí.“

Další kandidátní geny byly prokázány ve vazbě na metabolický syndrom a inzulinovou rezistenci. Inzulinorezistence je dědičná asi ze 60 %, inzulinémie jen z 30 %. Jsou známy kandidátní geny pro obezitu, hypertriglyceridémii, hypertenzi, inzulinovou rezistenci, chuť k jídlu a energetický výdej. Patří sem například geny pro IRS proteiny, amylín, inzulin, inzulinový receptor, transportéry GLUT 1, 2, 4, glykogen syntázu, fatty acid binding globulin, CD36-FAT – součásti LDL receptoru, PPA receptory a FOXC2 gen-transkripční faktory. U defektu tohoto faktoru lze u myši snadno dietně indukovat inzulinorezistenci. Onemocnění má pak výraznou podobu s lidským metabolickým syndromem. Zcela recentně byly popsány i nové mutace v oblasti PPA receptorů gama s typickým časným rozvojem metabolického syndromu u člověka“ (1).

Na tyto věty odrážející stav znalostí před dvěma lety práce autorek zcela logicky navazuje.

S kolegou M. Haluzíkem jsme předali v prosinci 2004 do tisku knihu o PPAR receptorech (2). O subtypech gama ve vztahu k diabetu a metabolickému syndromu jsou zde pouhé necelé dvě stránky. Práce autorek je také vhodně doplňuje a navíc mají autorky vlastní data z české populace. Škoda jen, že své výsledky necitují.

To, že v genetice diabetes mellitus 2. typu bude hrát roli struktura a funkce draselného kanálu beta buněk, je v podezření dávno. Sulfonylureová antidiabetika a příbuzné látky se u jednotlivců v efektu velmi liší. Před několika lety bylo definitivně uznáno, že cukrovka 2. typu je opravdu nemoc pankreatu a nejen nemoc vyvolaná inzulinorezistencí. Mechanizmy sekrece inzulinu musí být tedy geny ovliv-

PUBLIKACE 2

Šrámková D., Šrajer J., Bláha P. Korelace leptinu s antropometrickými parametry během redukční léčby obézních dětí. Sborn. lék. 2002;103(4):487-494.

KORELACE LEPTINU S ANTROPOMETRICKÝMI PARAMETRY BĚHEM REDUKČNÍ LÉČBY OBÉZNÍCH DĚTÍ

D. Šrámková, J. Šrajer, P. Bláha

Katedra antropologie a genetiky člověka Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy

Correlation between leptin and the anthropometric parameters during the weight reduction process in obese children. *Šrámková D., Šrajer J., Bláha P.*

Sborn. lék., Vol. 103 (2002) No. 4, p. 487–494

ABSTRACT: At present, obesity is considered one of the major health problems. It is a predisposing factor of several chronic diseases including non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) and coronary heart disease (CHD). Leptin levels in humans have been found to be highly correlated with total adiposity. We performed statistic analysis in order to identify linkage between leptin levels and anthropometric parameters in a group of 285 Czech obese children (152 girls and 133 boys) aged 7 to 18 years. The children were measured using the standard anthropometric technique according to MARTIN AND SALLER [16] at the beginning and end of a five-week therapeutic weight reduction programme. The skin fold thickness at 14 sites was assessed by means of Best calliper. The body composition was evaluated using Matiegka's technique. The leptin levels were investigated on the beginning and end of the reduction programme by direct enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). For the evaluation of the grade of obesity, body weight, BMI (body mass index), RI (Rohrer's index), FMI (fat mass index) and normalized body weight, normalized BMI and RI were plotted. Correlation analysis shows relation between leptin concentration and FMI to be the most significant. As to ponderal indexes, normalized RI shows the most significant positive correlation. Leptin concentrations are negatively correlated with the proportion of the weight of skeletal muscles by Matiegka both in girls and boys. Intersexual differences in correlations between leptin concentrations and normalized circumferences are observed, as well as in correlations between leptin and particular skin fold thickness. We also tested relations between the magnitude of leptin decreases and magnitude of decreases of anthropometric parameters. There is a strong endorsement both in girls and boys of positive correlation between decrease of leptin concentration and fat reduction. Interestingly, differences between boys and girls in relations between leptin decrease and change in lean body mass had been observed.

Key words: Obesity – Leptin – Reduction programme – Body composition

ABSTRAKT: Obezita je v dnešní době považována za jeden z nejobtížnějších zdravotních problémů. Jde o faktor predisponující k řadě chronických nemocí, jako např. non-inzulin dependentní *diabetes mellitus*

Výzkum je prováděn s podporou Interní grantové agentury Mzd ČR, grant č. 4033-3 a č. NB6597-3/2001.

Adresa autora / Mailing address: Mgr. Daniela Šrámková, Katedra antropologie a genetiky člověka Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, Viničná 7, 128 44 Praha 2 (Czech Republic) tel. 2195 4313

© Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha 2002

(NIDDM) a srdeční poruchy. Leptin je proteohormon produkovaný především adipocyty. Hraje významnou roli v regulaci množství tukových zásob v organismu. U člověka byla opakovaně potvrzena významná korelace mezi hladinou leptinu a celkovým obsahem tuku v těle. Zde předkládáme některé závěry statistické analýzy, provedené metodou korelačních rovnic za účelem zhodnocení vztahů mezi hladinami leptinu a antropometrickými daty u souboru 285 českých obézních dětí (152 dívek a 133 chlapců) od 7 do 18 let. Děti byly měřeny standardní antropometrickou metodou podle MARTINA A SALLERA [16] na začátku a na konci pětítýdenního léčebného redukčního programu. Čtrnáct kožních řas bylo měřeno kaliperem typu Best. Složení těla bylo počítáno metodou podle Matiegky. Výše hladin leptinu byla vyšetřována na začátku a na konci redukčního programu enzymově spřaženou imunochemickou metodou (ELISA). Pro rozlišení stupně obezity byl kromě tělesné hmotnosti užit BMI (body mass index), RI (Rohrerův index), FMI (fat mass index), dále byly zavedeny normované hodnoty tělesné hmotnosti, normovaný BMI a normovaný RI. Z korelační analýzy antropometrických a biochemických dat vyplývá následující pozorování: Nejvýznamnější u obou pohlaví je pozitivní závislost mezi koncentrací leptinu a FMI vypočteným ze zastoupení tuku podle Matiegky. Z hmotnostních indexů vykazuje nejvýznamnější kladnou závislost normovaný RI. Negativní je u chlapců i dívek korelace mezi koncentrací leptinu a procentuálním zastoupením svalové hmoty podle Matiegky. U normovaných hodnot obvodů jsou ve významnosti korelací intersexuální rozdíly. Odlišné je u obou pohlaví také pořadí významnosti u závislostí koncentrace leptinu na tloušťce různých kožních řas. Pokud jde o závislost velikosti procentuálního poklesu hladiny leptinu na poklesech antropometrických parametrů, u chlapců i dívek se jednoznačně potvrzuje kladná závislost na úbytku tuku. Zajímavé intersexuální rozdíly se projevují i u závislosti poklesu leptinu na změnách v zastoupení aktivní tělesné hmoty.

Klíčová slova: Obezita – Leptin – Redukční program – Tělesné složení

ÚVOD

Obezita je v současné době považována za jeden z nejobtížnějších zdravotních problémů, a to již v dětském věku [11]. Incidence obezity u dětí celosvětově vzrůstá. Vzhledem ke zjištění, že 80% obézních zůstává obézními i v dospělosti [2], stává se klíčovou problematika prevence obezity. K metabolickým rizikům spojených s obezitou patří poruchy lipidového a glycidového metabolismu [5, 8] a hyperurikemie [6], častější jsou u obézních endokrinní a kardiovaskulární poruchy [13, 15], některé typy nádorových onemocnění [18, 20], respirační potíže [9, 19]. K ortopedickým komplikacím se řadí zejména osteoartrózy, ploché nohy, vertebrální algický syndrom.

Proteohormon leptin, kódovaný ob-genem na 7. lidském chromozomu, sestává ze 167 aminokyselin [22]. Exprimován je podle dosavadních poznatků převážně v tukové tkáni adipocyty, v menší míře pak též v epitelu žaludku a v placentě [1, 17]. Za normálních okolností koreluje výše hladiny leptinu s množstvím tukové tkáně v organismu [4, 7]. Leptin v krvi cirkuluje vázán na proteiny a působí na centrální nervový systém, přesněji na hypotalamická centra se vztahem k regulaci energetické homeostázy. Mechanismus účinku je u zdravých osob takový, že dietou způsobená redukce tukové hmoty se odrazí v poklesu hladiny leptinu, což stimuluje příjem potravy a sníží energetický výdej. Naopak zmnožení tukové tkáně a následný vzestup koncentrace leptinu v krvi vede u zdravých lidí k útlumu chuti k jídlu a ke zvýšenému energetickému výdeji [10]. Nutno ovšem upozornit na vysokou heterogenitu v koncentraci leptinu u osob téže tělesné konstituce, věku i pohlaví. Hladiny leptinu totiž do velké míry závisejí na aktuální energetické bilanci [12]. Pokud je bilance vyrovnaná, leptin odráží celkové zastoupení tuku v organismu. Při negativní bilanci během redukčního programu klesá hladina leptinu

v předstihu před vlastním úbytkem tukové tkáně. Tento efekt se projeví již během 24 hodinového hladovění či 12 hodinového přejídání [21].

V roce 1998 jsme zahájili vyšetřování obézních dětí podstupujících pětítýdenní redukční režim v dětské léčebně v Poděbradech. Šlo o kompletní antropometrickou charakteristiku a stanovení koncentrace sérového leptinu, a to vždy na začátku a na konci redukčního pobytu. Cílem bylo posoudit vztah mezi hladinou leptinu a antropometrickými daty, dále zhodnotit závislost velikosti změn koncentrace leptinu na změnách jednotlivých antropometrických parametrů se zřetelem na intersexuální rozdíly.

MATERIÁL A METODA

Děti, u kterých byla zjišťována antropometrická a biochemická data, podstoupily pětítýdenní redukční pobyt v léčebně Dr. L. Filipa v Poděbradech v časovém období od března 1998 do února 1999. Kompletní antropometrické vyšetření bylo prováděno standardní technikou podle MARTINA A SALLERA [16]. Kromě tělesné hmotnosti a výšky bylo měřeno 11 délkových a výškových rozměrů, 11 rozměrů šířkových, 13 obvodů a 14 kožních řas. Tloušťka kožních řas byla měřena na začátku i na konci pobytu týměž antropologem, použit byl kaliper typu Best.

Odběr žilní krve byl prováděn mezi 8. a 10. hodinou dopolední a vzorky byly transportovány v přenosném chladicím boxu do biochemického oddělení Fakultní nemocnice v Motole k dalšímu zpracování. Sérové koncentrace leptinu byly stanoveny metodou ELISA na kitech firmy Bio Vendor-Laboratorní medicína, s. r. o., Brno.

Do zpracování bylo zahrnuto 285 dětí, z toho 152 dívek od 7 do 18 let (průměrný věk 12,6 roku, $SD \pm 2,619$) a 133 chlapců od 7 do 17 let (průměrný věk 12,0 let, $SD \pm 2,197$).

Somatické charakteristiky byly zpracovány programem ANTROPO, jehož výstup kompletně postihuje tělesný rozvoj jedince a umožňuje i vyhodnocení celých souborů probandů podle řady volitelných kritérií, která je možno volně kombinovat.

Pro správné zhodnocení základních antropometrických dat při různém věku dětí byly vypočteny normované hodnoty, tzv. Z-score. Jako referenční soubory byly použity děti sledované v rámci projektu V. CAV 1991 (V. celostátní antropologický výzkum dětí a mládeže – české země). Výzkum sledoval 90 910 dětí od 0 do 18 let [14].

Srovnání námi vyšetřeného souboru s referenčním umožnil program VÝVOJ DÍTĚTE. K vyjádření závažnosti obezity bylo do zpracování zařazeno, kromě tělesné hmotnosti a jejích normovaných hodnot, ještě několik dalších charakteristik: BMI a jeho normované hodnoty, RI a jeho normované hodnoty, dále zastoupení tukové složky vypočtené podle Matiegky a vyjádřené jednak v procentech celkové tělesné hmotnosti a také absolutně v kilogramech – od obou způsobů byly opět vypočteny normované hodnoty. Další zařazenou charakteristikou posuzující stav tukové tkáně je tzv. fat mass index – FMI: Rozložíme-li BMI na složku tukovou a tukuprostou [3], je pro tukovou složku užito označení FMI:

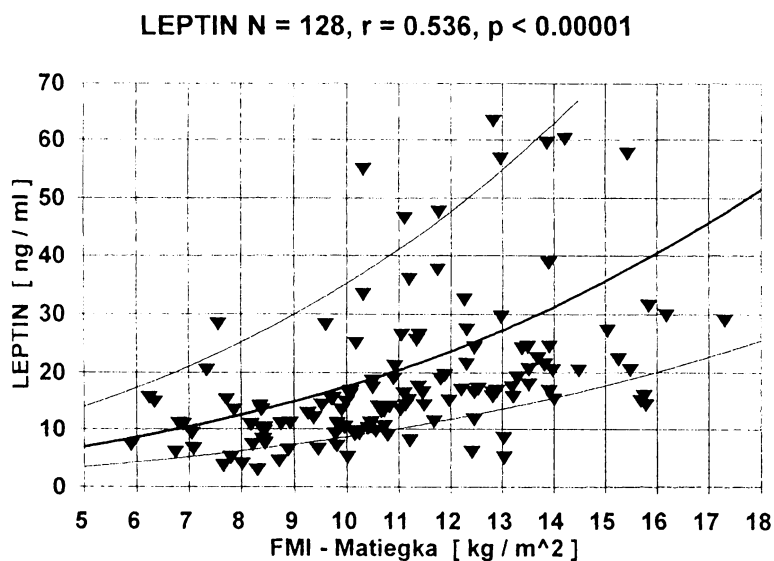
$$FMI = \frac{\text{hmotnost tuku (kg)}}{\text{tělesná výška (m}^2\text{)}}$$

Při testování významnosti korelace proměnných bylo použito kromě lineárních rovnic vždy současně několika transformací, vybrán byl výsledek rovnice vykazující nejvyšší signifikanci.

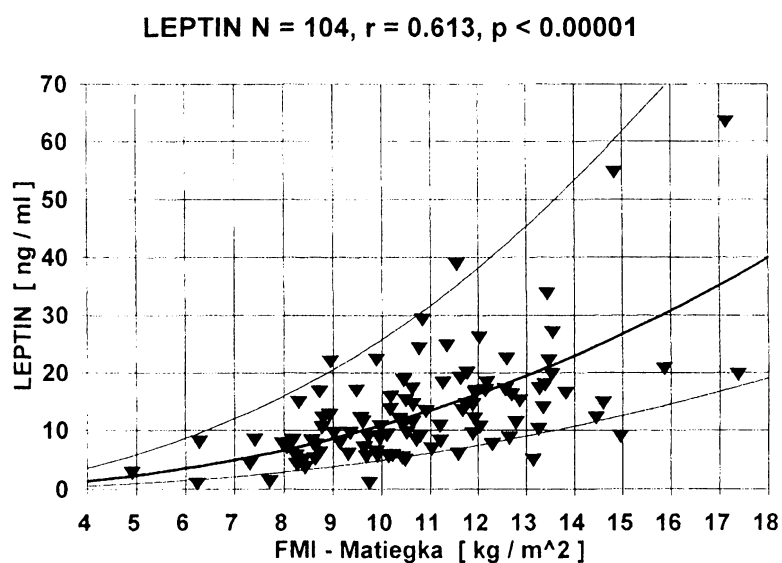
VÝSLEDKY

Z korelací koncentrace leptinu (osa y na grafech) na antropometrických parametrech (osa x na grafech) získaných na začátku redukčního režimu vyplývá, že statisticky nejvýznamnější

je u obou pohlaví závislost na FMI vypočteným ze zastoupení tuku podle Matiegky. U dívek i chlapců jde o vysoce významnou závislost mírně zrychleně stoupající (Graf 1, Graf 2).



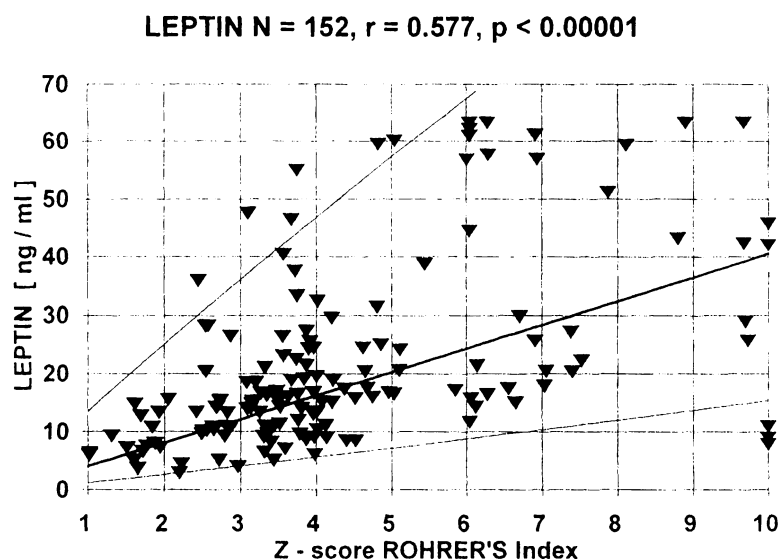
Graf 1 – Závislost počátečních hodnot leptinu na FMI podle Matiegky, dívky.



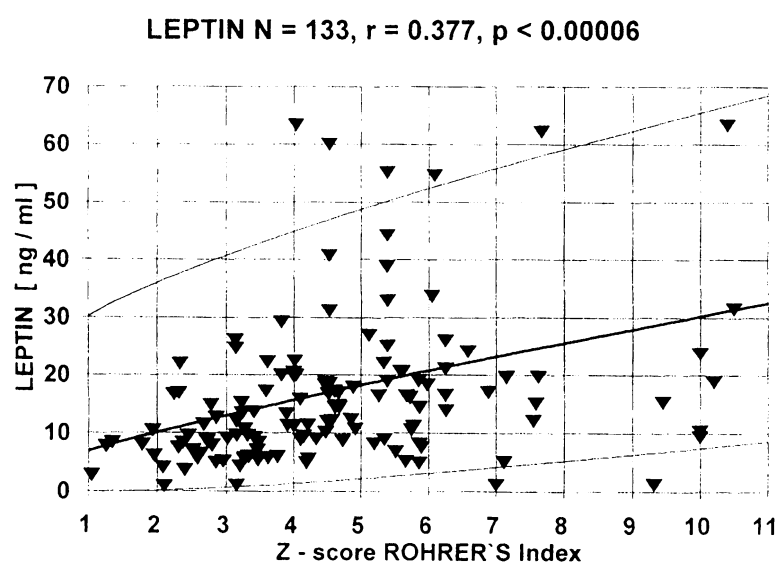
Graf 2 – Závislost počátečních hodnot leptinu na FMI podle Matiegky, chlapci.

Z hmotnostních indexů vykazuje nejvýznamnější kladnou závislost normovaný RI (Graf 3, Graf 4).

Statisticky vysoce významná, avšak negativní, je u dívek i chlapců korelace mezi koncentrací leptinu a procentuálním zastoupením svalové hmoty podle Matiegky. Jde o očekávané zjištění, neboť čím menší je procentuální zastoupení svalů, tím relativně větší je zastoupení tuku (podíl kostní hmoty není nutné v této souvislosti zohledňovat).



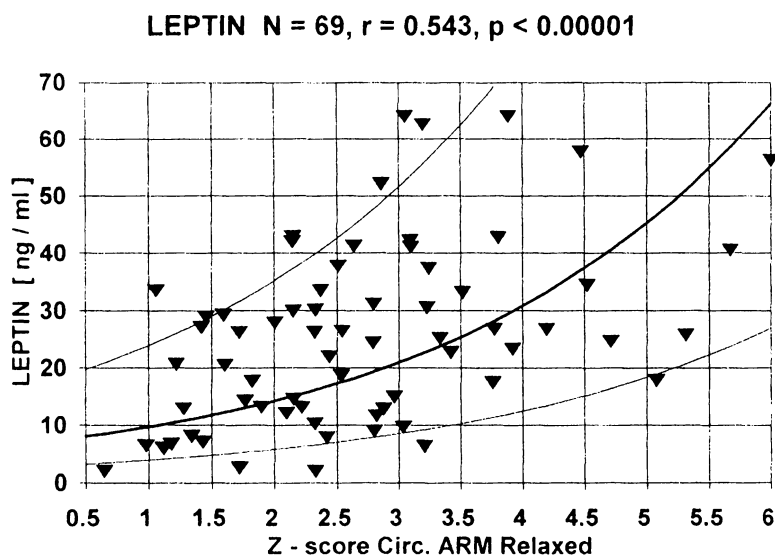
Graf 3 – Závislost počátečních hodnot leptinu na Z-score Rohrerova indexu, dívky.



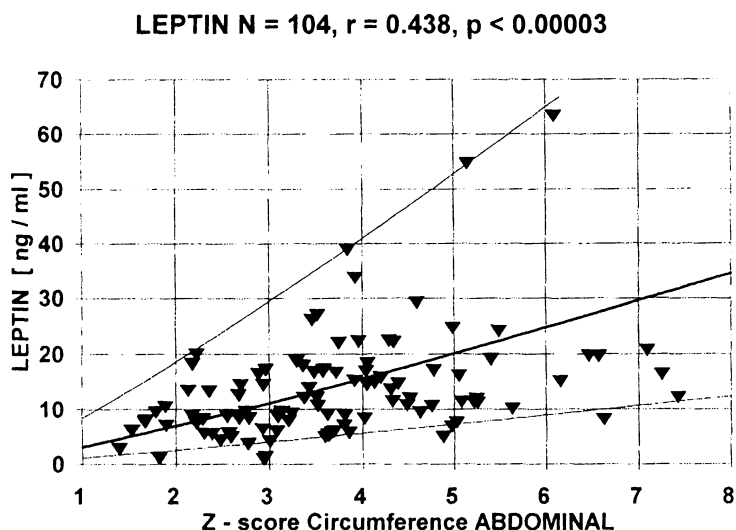
Graf 4 – Závislost počátečních hodnot leptinu na Z-score Rohrerova indexu, chlapci.

U normovaných hodnot tělesných obvodů se ve významnosti korelací projevují intersexuální rozdíly. Zatímco u dívek je statisticky nejvýznamnější závislost koncentrace leptinu na normovaných hodnotách obvodu relaxované paže (Graf 5), u chlapců je nejvýznamnější korelace s normovanými hodnotami obvodu břicha (Graf 6).

Odlišné pořadí významnosti je u obou pohlaví také u závislostí koncentrace leptinu na tloušťce jednotlivých kožních řas. Shoda se však projevila u řasy korelující u chlapců i dívek statisticky nejvýznamněji; jde o kožní řasu na stehně nad čtyřhlavým svalem. Další v pořadí významnosti je u dívek kožní řasa na bříse, u chlapců kožní řasa suprailiackální.



Graf 5 – Závislost počátečních hodnot leptinu na Z-score obvodu relaxované paže, dívky.



Graf 6 – Závislost počátečních hodnot leptinu na Z-score abdominálním obvodu, chlapci.

Hodnoty statistické významnosti všech zde uvedených a několika dalších veličin jsou uvedeny v Tabulce 1.

Hodnocení závislosti procentuálního poklesu koncentrace leptinu během léčby na procentuálním poklesu ostatních antropometrických údajů potvrzuje jednoznačně kladnou závislost na úbytku tuku ($p=0,011$ pro vztah poklesu koncentrace leptinu a poklesu FMI pro dívky, pro chlapce $p=0,006$).

Významný intersexuální rozdíl se projevil při hodnocení vztahu poklesu leptinu k poklesům aktivní tělesné hmoty. Zatímco u chlapců byla prokázána statisticky významná negativní korelace ($p=0,028$), u dívek tato závislost nevykazuje statistickou významnost. Oproti tomu statisticky vysoce významná a negativní je u dívek korelace s poklesem hodnot obvodu středního stehna ($p=0,004$), parametrem, který u chlapců významně nekoreluje. Tato zjištění představují zajímavé podklady pro diskusi.

Tabulka 1 – Korelace koncentrace leptinu s proměnnou X před redukcí

Proměnná X	Dívky			Chlapci		
	N	r	p	N	r	p
Z-skóre Rohrerův index	152	0,577	<10E-07	133	0,377	5,60E-05
Z-skóre obvod relaxované paže	128	0,543	<10E-07	104	0,258	0,017
FMI-Matiegka (kg/m ²)	128	0,536	<10E-07	104	0,613	<10E-07
Kožní řasa na stehně nad čtyřhlavým svalem (mm)	128	0,511	<10E-07	104	0,582	<10E-07
Z-skóre obvod hrudníku přes mezosternale	128	0,511	<10E-07	103	0,273	0,012
Z-skóre gluteální obvod	128	0,501	<10E-07	104	0,402	1,21E-04
Kožní řasa na břicho	128	0,465	<10E-07	104	0,412	7,69E-05
Kožní řasa suprailiackální (mm)	128	0,445	1,69E-06	104	0,516	<10E-07
Zastoupení hmotnosti svalstva – Matiegka (%)	128	-0,385	5,01E-05	104	-0,304	0,005
Z-skóre gluteální obvod stehna	128	0,429	4,47E-06	104	0,363	5,96E-04
Z-skóre obvod břicha	128	0,402	2,14E-05	104	0,438	2,18E-05
Kožní řasa nad patelou (mm)	128	0,353	2,27E-04	104	0,508	<10E-07

DISKUSE

Předkládané výsledky potvrzují silnou závislost mezi koncentrací leptinu v séru a obsahem celkového tělesného tuku.

Pořadí závislostí mezi jednotlivými normovanými obvody a koncentrací leptinu je u dívek a chlapců rozdílné. Normovaný obvod relaxované paže u dívek vykazuje v této studii jednu z nejvýznamnějších závislostí ve vztahu ke koncentraci leptinu.

Intersexuální rozdíly u korelací, vyjadřujících závislost poklesu koncentrace leptinu v séru na redukcí způsobených změnách antropometrických parametrů, lze interpretovat tak, že chlapecký a mužský organismus má silnou tendenci zachovávat aktivní tělesnou hmotu i během výrazné redukce tuku, zde vyjádřené nepřímo ve formě poklesu koncentrace leptinu. Taková reakce nebyla zaznamenána u dívek, u nichž lze oproti tomu pozorovat silnou tendenci k uchování tukové vrstvy v oblasti typické pro ukládání tuku u žen. Dané pozorování lze vysvětlit rozdílnou hormonální regulací, která je v přímém vztahu k biologické funkci (těhotenství u žen a historicky podmíněná výhodnost fyzické zdatnosti u mužů).

Poděkování: Autoři děkují vedení Dětské léčebny Dr. L. Filipa za umožnění výzkumu a za vstřícnost při jeho realizaci.

LITERATURA

1. BADO A. *et al.*: The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998, 394, p. 790–793.
2. BLÁHA P.: Základní tělesné charakteristiky českých obézních dětí od 6 do 16 let. ÚNZ VS, Praha 1990 (*in Czech*).
3. BLÁHA P., LISÁ L., ŠRAJER J.: Hodnocení dětské obezity a její léčby pomocí metod klinické antropologie. *Čs. Pediat.* 1994, 49, p. 395–403 (*in Czech*).
4. BLUM W. F. *et al.*: Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass

- index, body fat mass, gender, pubertal stage and testosterone. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 1997, 82, p. 2904–2910.
5. FELBER J. P. *et al.*: Metabolic origin of insulin resistance in obesity with and without DM. *Diabetologia* 1993, 36, p. 1221–1229.
 6. HAINER V. *et al.*: Obezita: etiopatogeneze, diagnostika a terapie. Galén, Praha 1997 (*in Czech*).
 7. HASSINK S. G. *et al.*: Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics* 1996, 98, p. 201–203.
 8. CHU N. F. *et al.*: Clustering of cardiovascular disease risk factors among obese schoolchildren. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, 67, p. 1141–1146.
 9. JEDRYCHOWSKI W. *et al.*: Predisposition to acute respiratory infections among overweight preadolescent children. *Public Health* 1998, 112, p. 189–195.
 10. KEIM N. L. *et al.*: Relation between circulating leptin concentrations and appetite during a prolonged, moderate energy deficit in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, 68, p. 794–801.
 11. KLISH W. J.: Childhood obesity: pathophysiology and treatment. *Acta Paediatr. Jpn.* 1995, 37 (1), p. 1–6.
 12. LEVINE A. S., BILLINGTON CH. J.: Do circulating leptin concentrations reflect body adiposity or energy flux? *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, 68, p. 761–762.
 13. LÉVY E. *et al.*: The economic cost of obesity: French situation. *Int. J. Obesity* 19, 1995, p. 788–792.
 14. LHOŠKÁ L., BLÁHA P., VIGNEROVÁ J., ROTH Z., PROKOPEC M.: V. celostátní antropologický výzkum dětí a mládeže 1991 (české země). SZÚ, Praha 1993 (*in Czech*).
 15. MANSON J. E. *et al.*: Body weight and mortality among women. *N. Engl. J. Med.* 1995, 333, p. 677–685.
 16. MARTIN S., SALLER K.: *Lehrbuch der Anthropologie*. Gustav Fischer, Stuttgart 1957.
 17. MASUZAKI H. *et al.*: Nonadipose tissue production of leptin: leptin is a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Med.* 1997, 3, p. 1029–1033.
 18. MOLLER H. *et al.*: Obesity and cancer risk: Danish record-linkage study. *Eur. J. Cancer* 1994, 30, p. 344–350.
 19. RICHMAN R. *et al.*: The prevalence of obstructive sleep apnea in an obese female population. *Int. J. Obesity Rel. Metab. Dis.* 1994, 18, p. 173–177.
 20. SCHAPIRA D. V. *et al.*: Abdominal obesity and breast cancer risk. *Ann. Int. Med.* 1990, 111, p. 182–186.
 21. SINHA M. K., CARO J. F.: Clinical aspects of leptin. *Vitam. Horm.* 1998, 54, p. 1–30.
 22. ZHANG Y. *et al.*: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994, 372, p. 425–432.

PUBLIKACE 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**

Determinants of Circulating Adiponectin in Women with Polycystic Ovary Syndrome

Jana Vrbíková · Kateřina Dvořáková · Martin Hill · Josef Včelák · Soňa Stanická
Markéta Vaňková · Daniela Šrámková · Karel Vondra · Běla Bendlová
Luboslav Stárka

Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

Key Words

Polycystic ovary · Adiponectin · Ghrelin · Androgen ·
Insulin resistance · Euglycemic clamp

Abstract

Background and Aim: Adiponectin is regarded as a possible link between adiposity and insulin resistance. Ghrelin and leptin are considered as signals of energy status. We evaluated the relationships between these peptides, androgens and insulin sensitivity in women affected by polycystic ovary syndrome. **Methods:** Thirty-six women with PCOS were examined with euglycemic hyperinsulinemic clamp (to determine M/I, index of insulin sensitivity). Leptin, ghrelin, adiponectin, androgens, and SHBG were determined. Statistics was done using correlation analysis and backward stepwise multiple regression. **Results:** The positive correlation of adiponectin with testosterone remains significant even after adjustment for BMI ($p = 0.01$), M/I ($p = 0.009$) and for both M/I and BMI ($p = 0.02$). In multiple regression with testosterone, M/I, leptin and ghrelin as independent variables, the model including testosterone ($p = 0.03$) and ghrelin ($p = 0.002$) explained 49% of the variability ($p < 0.0012$) of adiponectin. **Conclusions:** Both adiponectin and ghrelin can be involved in the pathophysiology of PCOS but their relation must be delineated further.

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most commonly encountered endocrinopathies of women in fertile age. Its exact pathogenesis remains unknown; the complex interplay between ovarian and adrenal androgen production, obesity and insulin sensitivity (IS) is involved. Decreased insulin sensitivity is often considered as a regular component of PCOS [1–3]. But, on the other hand, there are studies which do not confirm differences in IS, especially in nonobese PCOS [4–7]. In recent years, considerable attention has been paid to adipocytokines – factors produced by adipose tissue, which are involved in maintaining insulin sensitivity.

Adiponectin is a matrix protein, which is induced during adipogenesis, and is the only known protein produced in adipose tissue that is decreased in obesity [8]. Its exact physiological role is still not fully understood. Most studies show that adiponectin is closely correlated to IS and that this relationship may be independent of obesity [9, 10]. On the other hand, adiponectin knockout mice have been found to demonstrate no difference in IS when compared to wild-type mice [11].

To date, data regarding adiponectin levels in PCOS women in relation to obesity and insulin sensitivity has indicated, in contrast to the studies cited above, that adiponectin is more closely related to the fat mass than (if

Copyright © 2005 S. Karger AG, Basel

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2005 S. Karger AG, Basel
0378-7346/05/0603-0155\$22.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/goi

Jana Vrbíková, MD
Institute of Endocrinology
Národní 8
CZ-116 94 Prague 1 (Czech Republic)
Tel. +420 224 905 111, Fax +420 224 905 325, E-Mail jvrbikova@endo.cz

at all) to insulin sensitivity [12, 13]. These studies, however, have unfortunately not used methods other than HOMA or the fasting insulin to glucose ratio for the measurement of insulin sensitivity.

Similarly, there are discrepancies concerning the relationship of adiponectin to androgens. In some studies, adiponectin levels have exhibited sexual dimorphism, with lower concentrations in males than in females [14] but this has not been confirmed by all authors [9]. No relationship between adiponectin and androgens in healthy females has been found [15]. In PCOS, the results published to date are rather discrepant; a negative correlation between adiponectin and androstenedione [12] or no relationship between adiponectin and serum androgens [13] has been found. Recently, an interaction between steroid synthesis and adiponectin levels was supposed on the basis of the difference between the genotype frequencies of GG and TG genotypes in exon 2 (T45G polymorphism of the adiponectin gene) in PCOS patients with high or low androstenedione levels [16].

Ghrelin is a peptide of 28 amino acids, produced primarily by stomach, but also by many other tissues. Its role in CNS is to signalize an energy balance. Ghrelin was shown to be reduced in obese individuals [17, 18]. Low ghrelin was shown to be independently associated with type 2 diabetes mellitus [19]. In PCOS, fasting ghrelin was found to be reduced by some [20–22], but not all studies [23]. The relationship of ghrelin and insulin sensitivity is not clear till now.

The aim of the present study was to examine relationship between adipocytokines, androgens and insulin sensitivity as measured by the euglycemic hyperinsulinemic clamp in PCOS women.

Material and Methods

The study group consisted of 36 oligo/amenorrheic women with PCOS matching NIH criteria [24], all with the clinical manifestation of hyperandrogenemia as hirsutism and/or acne and with the elevation of the free testosterone index and/or androstenedione (A) above the upper limit of the normal range (e.g. 0.40–2.65 nmol/l for testosterone (T) and 1.6–5.4 nmol/l for A) or lower limit (43–95 nmol/l) for sex hormone-binding globulin, SHBG [25]. All other causes of hyperandrogenemia were excluded appropriately. Vaginal ultrasonography was performed in all but 3 patients. In 28 subjects, PCO was found according to revised criteria of Rotterdam consensus; in 4 women, ovaries had normal appearance and in 1 multifollicular ovaries were found not classified as PCO. Thus, all of the selected patients fulfill both NIH and Rotterdam consensus criteria [26]. None of the patients had taken oral contraceptives or any other steroid medication during the preceding 3 months. The local ethical committee of the Institute of Endocrinology in Prague

approved the protocol for the study. The patients were evaluated at the clinical department as outpatients, and after signing informed written consent underwent blood sampling for hormonal and biochemical examinations between days 3 and 6 of the menstrual cycle or, in the case of secondary amenorrhea, at any time.

After collecting basal blood samples, a 2-hour euglycemic hyperinsulinemic ($1 \text{ mIU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) clamp was performed as described elsewhere [27]. Briefly, a cannula for blood sampling during the clamp was inserted into the wrist vein and this arm was heated to 60°C . A double-lumen catheter for the continuous infusion of 15% glucose with 7.5% KCl and for insulin infusion was inserted into the cubital vein of the ipsilateral arm. During the clamp, blood glucose levels were repeatedly determined by glucose analyzer and blood glucose was maintained at the level of 5 mmol/l with the CV of 5%. The following parameters were calculated based on the clamp results: glucose disposal rate (M , $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) was defined as the amount of glucose supplied by the infusion to maintain the desired blood glucose level and the insulin sensitivity index (ISI) was defined as the ratio of the glucose disposal rate to the average insulin concentration during the monitored period (M/I , $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ per $\text{mU} \cdot \text{l}^{-1} \times 100$).

Blood glucose was determined in the whole blood by the electrochemical method (Super GL, Germany). Insulin was estimated by IRMA kit from Immunotech (Marseilles, France), with interassay CV 5.3%. Testosterone (T), androstenedione (A), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and sex hormone-binding globulin (SHBG) were determined as described elsewhere [28]; with interassay coefficients of variation 10, 10.2, 10.6 and 4.8%, respectively. Leptin was determined by RIA kit (Linco Research, St. Charles, Miss., USA), with a sensitivity of 0.5 ng/ml and intra- and interassay coefficients of variations of 8.3 and 6.0%, respectively. Ghrelin (total) was determined by RIA (Linco Research), with a sensitivity of 100 pg/ml and intra- and interassay variations of 10 and 15%, respectively. Adiponectin (Acrp30) was determined by ELISA kit (Linco Research) with sensitivity 1.0 ng/ml and intra- and interassay variation 1.8–6.2 and 6.9–9.3%, respectively.

Statistical Analyses

Correlation analysis, including partial correlations adjusted to constant testosterone, M/I and BMI, was used for the evaluation of the relationships between adiponectin, other adipokines, BMI, insulin sensitivity and androgens. To avoid non-Gaussian data distribution and non-constant variance, Spearman's correlations were used. In addition, multiple regression analysis was used to find the linear combination of variables best predicting the adiponectin levels. To approximate Gaussian data distribution and to straighten the relationships between the variables, the data was transformed by a power transformation to minimum skewness in individual dimensions. To avoid the influence of univariate outliers all data with absolute studentized values greater than 3 were excluded. The proportion of outliers eliminated never exceeded 5% of the total. Respecting the limited number of experiments, the correlation matrix of the transformed variables was used for choosing the preliminary set of predictors. These were further evaluated using backward stepwise multiple regression with F-statistics less than 4 as the exclusion criterion. Statistics was done using the software Statgraphics plus v.5.1 from Manugistics (Rockville, Md., USA).

Table 1. Anthropometric and biochemical parameters in PCOS women

	Mean	SD	Median	Range (min-max)
Age, years	28.2	6.2	27	18-46
Body mass index, kg/m ²	27.4	5.6	26.3	18.6-39.0
Testosterone, nmol/l	2.9	1.1	2.9	1.60-5.35
Dehydroepiandrosterone sulfate, μ mol/l	5.6	2.9	5.1	0.80-11.5
Sex hormone-binding globulin, nmol/l	33.0	17.4	26.1	9.1-68.4
Leptin, ng/ml	13.9	6.8	12.3	3.6-32.5
Ghrelin, pg/ml	1,810.3	512.2	1,729.0	922-3,340
Adiponectin, μ g/l	23.7	12.3	20.2	7.6-47.8
Insulin sensitivity index, $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ per $\text{mU} \cdot \text{l}^{-1} \times 100$	11.7	4.1	12.2	4.2-20.9

Table 2. Spearman's correlations between insulin sensitivity, androgen levels and adipocytokines in women affected with PCOS

	T	DHEAS	SHBG	Ghrelin	Leptin	Acrp30	M/I
DHEAS	0.1453 0.3977 36						
SHBG	0.4714 0.0037 36	-0.0389 0.8219 36					
Ghrelin	0.0862 0.6626 28	0.2105 0.2823 28	0.5497 0.0024 28				
Leptin	-0.2216 0.2308 31	-0.1681 0.3659 31	-0.5041 0.0038 31	-0.7003 0.0002 23			
Acrp30	0.5843 0.0022 25	0.0662 0.7534 25	0.1912 0.3599 25	0.1808 0.4090 23	-0.3156 0.1635 21		
M/I	0.3159 0.1327 24	0.1478 0.4906 24	0.5745 0.0033 24	0.4932 0.0319 19	-0.5059 0.0138 23	0.4561 0.0497 19	
BMI	-0.3422 0.0410 36	-0.0529 0.7593 36	-0.5795 0.0002 36	-0.6116 0.0005 28	0.7327 0.0000 31	-0.4586 0.0211 25	-0.3957 0.0556 24

T = Testosterone; DHEAS = dehydroepiandrosterone sulfate; SHBG = sex hormone-binding globulin; Acrp30 = adiponectin; M/I = index of insulin sensitivity. **Bold** numbers denote statistical significance ($p < 0.05$).

Results

The clinical and biochemical characteristics of the patients are shown in table 1. The correlations are demonstrated in table 2. Adiponectin correlated negatively with

BMI, and positively with M/I and T. Leptin correlated positively with BMI and negatively with M/I, ghrelin and SHBG. Ghrelin correlated positively with SHBG and M/I and negatively with leptin and BMI:

Table 3. Multiple regression analysis of the relationship between adiponectin (Acrp30) and testosterone, insulin sensitivity (M/I), leptin and ghrelin in women with PCOS

Parameter	Estimate	SE	T statistic	p value
<i>Dependent variable: Acrp30^{0.43}</i>				
Constant	-1.53	2.32	-0.66	0.5157
Testosterone ^{0.56}	1.95	0.86	2.26	0.0321
log (M/I)	0.601	0.301	1.996	0.0565
Leptin ^{0.13}	2.19	1.39	1.57	0.1282
Ghrelin	0.00101	0.00101	0.00101	0.0021

R² = 49%; p < 0.0012; n = 31.

Table 4. Multiple regression analysis of the relationship between ghrelin, adiponectin (Acrp30) and insulin sensitivity (M/I) in women with PCOS

Parameter	Estimate	SE	T statistic	p value
<i>Dependent variable: ghrelin</i>				
Constant	94.15	307.27	0.31	0.7615
Acrp30	266.99	75.90	3.52	0.0015
M/I	377.680	128.894	2.930	0.0065

R² = 56%; p < 0.00001; n = 31.

After adjustment for BMI, in the case of adiponectin, only positive correlation with T remained significant (r = 0.51; p = 0.01). Leptin, after BMI adjustment, correlated negatively with ghrelin (r = -0.47; p = 0.03).

After adjustment for M/I, the correlation between adiponectin and T remained significant (r = 0.52; p = 0.009). Leptin correlated negatively with ghrelin (r = -0.60; p = 0.003) and with BMI (r = -0.60; p = 0.00005). Concerning ghrelin, besides negative correlation with leptin, positive correlation with SHBG (r = 0.37; p = 0.05) and negative correlation with BMI (r = -0.52; p = 0.005) remained significant.

When adjusted for both BMI and M/I, the relationship of leptin to ghrelin was no longer significant. In fact, only positive correlation between adiponectin and testosterone remained significant (r = 0.48; p = 0.02).

Then, we applied multiple regression with adiponectin as the dependent variable and T, M/I, leptin and ghrelin as independent variables. Testosterone (p = 0.03) and ghrelin (p = 0.002) were significantly positively associated with adiponectin levels. The association between M/I and adiponectin only approached statistical significance. This

model explained 49% of the variability of adiponectin levels (p < 0.0012) (table 3).

When ghrelin was chosen as dependent variable, and M/I, adiponectin, leptin and testosterone as independent variables, a model comprising only adiponectin (p = 0.002) and M/I (p = 0.007) was built. The highly significant model (p = 0.00001) explained 56% of the variability of ghrelin levels (table 4).

Discussion

Insulin resistance is one of the key factors in the pathogenesis of PCOS. Nevertheless, a significant phenotypic variability in these women exists. There have been only few studies [29, 30] conducted on larger groups of PCOS women evaluating whether insulin resistance is invariably connected with PCOS, and, consequently, whether the majority of lean PCOS women is thus insulin resistant, or whether insulin resistance is only an epiphenomenon related to body weight. Both of these studies found hyperinsulinemia and increased insulin secretion in lean PCOS. On the other hand, concerning the insulin resistance it was consistently observed only in connection with concomitant obesity.

Adiponectin has been shown to be the only adipocyte-derived hormone that is decreased in obesity [9]. The administration of adiponectin to normal, lipoatrophic or obese mice has improved insulin sensitivity [31–33]. Further, adiponectin levels predict insulin sensitivity independently of the degree of the adiposity (BMI, percentage of body fat) or body fat distribution (WHR) in the general population [10]. Adiponectin is therefore probably a potent insulin sensitizer.

In the present study, the authors have shown that adiponectin in PCOS correlates positively with insulin sensitivity, but that this correlation is dependent on BMI and does not remain significant after adjustment for BMI. Former studies of adiponectin levels in PCOS used glucose to insulin ratio [12] or HOMA-R [13], i.e. methods, which are prone to a great variability, particularly in PCOS women [34]. Subsequently, it has been shown that in PCOS women HOMA-R does not correlate with the insulin sensitivity defined by the euglycemic clamp [35]. To the best of our knowledge, the presented study is the first one in PCOS evaluating the relationship of insulin sensitivity defined by a gold standard method-euglycemic clamp with adipocytokines.

Our study has been limited by the fact that we did not examine body composition. It thus remains to be estab-

lished whether body fat distribution could be another confounder of the complex relationship between adiposity, insulin sensitivity and adipocytokines in PCOS.

Concerning androgens and adiponectin, positive correlation of adiponectin and testosterone was revealed. This result seems paradoxical, in comparison with data in the literature regarding lower levels of adiponectin in males than in females [14]. On the other hand, actually, no relationship between adiponectin and androgens was found in healthy women [15]. Latter, it was shown, that estradiol suppresses adiponectin levels [36], and a more complex regulation in adiponectin levels in PCOS could therefore be involved. Estrogen balance in PCOS has not been fully characterized to date [37]. The question thus remains as to whether the estrogen/androgen balance could play a role in the determination of adiponectin levels in PCOS.

We constructed a regression model with adiponectin as a dependent variable and ghrelin, leptin, testosterone and insulin sensitivity as independent variables. The significant positive associations between adiponectin and ghrelin and between adiponectin and testosterone were found. This is the first report concerning the mutual relationship of ghrelin and adiponectin in PCOS women. However, on the basis of presented results, it is not possible to discern the causality, e.g. if adiponectin levels are controlled directly by ghrelin or vice versa.

We demonstrated that ghrelin levels did not significantly correlate with testosterone or DHEAS. These results are in accordance with some [21] but not with other reports [22]. A negative correlation between ghrelin and leptin was found and this was independent of either BMI or insulin sensitivity. The finding is in accordance with other studies [38] showing an inverse relationship between leptin and ghrelin [18]. The both hormones are secreted in the opposite sides of energy balance.

The relationship of ghrelin and insulin sensitivity is not clear till now. There are reports demonstrating a correlation of ghrelin with insulin sensitivity as defined by QUICKI in the random sample of population [19]. On the other hand, in men, when the insulin sensitivity was examined by euglycemic clamp and the data were adjusted for fat free mass, no correlation between ghrelin and insulin sensitivity index was observed [39]. Insulin acutely suppressed ghrelin [40] and ghrelin stimulated secretion [41, 42] and inhibited [43] insulin secretion depending on the dose and conditions (in vitro vs. in humans). We have demonstrated a positive correlation of ghrelin with M/I; however, after adjustment for BMI, it was no longer significant. When adjusted for M/I, the

negative correlation of ghrelin and BMI remained significant. This is in full agreement with the data showing lower ghrelin levels in obese patients [17].

The observed relationship of adiponectin and ghrelin is of interest, as the data concerning these two adipocytokines in their balance is sparse. It was shown that adiponectin and ghrelin did not correlate in a cohort of elderly women [44]. On the other hand, ghrelin impaired strongly the adiponectin gene expression in brown adipocytes [45]. It is also suggested, that these hormones regulate in concerted action the AMP-activated kinase (AMPK) in hypothalamus and thus, they regulate food intake [46].

In conclusion, the authors have shown that the relationship between adiponectin, ghrelin and testosterone do not depend on BMI and insulin sensitivity in PCOS. In addition, ghrelin depends on both obesity and adiponectin levels. The importance of the direct pathophysiological impact of the relationships remains to be established.

Acknowledgement

This study was supported by grants No. 301/04/1085 of the Grant Agency of Czech Republic and of IGA MZ CR No. 7391/3. The authors are grateful for the excellent technical assistance of Mrs. R. Bajtlová, J. Novotná, H. Opltová and H. Vrátná.

References

- Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A: Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989;38:1165–1174.
- Dunaif A, Finegood DT: Beta-cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:942–947.
- Toprak S, Yonem A, Cakir B, Guler S, Azal O, Ozata M, Corakci A: Insulin resistance in non-obese patients with polycystic ovary syndrome. *Horm Res* 2001;55:65–70.
- Holte J: Disturbances in insulin secretion and sensitivity in women with the polycystic ovary syndrome. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1996;10:221–247.
- Vrbikova J, Cibula D, Dvorakova K, Stanicka S, Sindelka G, Hill M, Fanta M, Vondra K, Skrha J: Insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2942–2945.
- Ovesen P, Moller J, Ingerslev H, Jorgensen JO, Mengel A, Schmitz O, Alberti K G, Moller N: Normal basal and insulin-stimulated fuel metabolism in lean women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1636–1640.
- Morin-Papunen LC, Vauhkonen I, Koivunen RM, Ruokonen A, Tapanainen JS: Insulin sensitivity, insulin secretion, and metabolic and hormonal parameters in healthy women and women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000;15:1266–1274.
- 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* 1999;257:79–83.
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni P A: Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1930–1935.
- Tschritter O, Fritsche A, Thamer C, Haap M, Shirkavand F, Rahe S, Staiger H, Maerker E, Haring H, Stumvoll M: Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 2003;52:239–243.
- Ma K, Cabrero A, Saha PK, Kojima H, Li L, Chang BH, Paul A, Chan L: Increased beta-oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. *J Biol Chem* 2002;277:34658–34661.
- Panidis D, Kourtis A, Farmakiotis D, Mouslech T, Rouso D, Koliakos G: Serum adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2003;18:1790–1796.
- Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, Milan G, Mioni R, Pagano C, Zullo F, Colao A, Lombardi G, Vettor R: Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2619–2623.
- 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;51:2734–2741.
- Gavrila A, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Miller LC, Orlova C, Mantzoros CS: Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: Cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4823–4831.
- Panidis D, Kourtis A, Kukuviitis A, Farmakiotis D, Xita N, Georgiou I, Tsatsoulis A: Association of the T45G polymorphism in exon 2 of the adiponectin gene with polycystic ovary syndrome: Role of [Delta]4-androstenedione. *Hum Reprod* 2004.
- Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML: Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001;50:707–709.
- Shiiba T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S: Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:240–244.
- Poykko SM, Kellokoski E, Horkko S, Kauma H, Kesaniemi YA, Ukkola O: Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:2546–2553.
- Schoff C, Horn R, Schill T, Schlosser HW, Muller MJ, Brabant G: Circulating ghrelin levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4607–10.
- Pagotto U, Gambineri A, Vicennati V, Heiman M L, Tschop M, Pasquali R: Plasma ghrelin, obesity, and the polycystic ovary syndrome: Correlation with insulin resistance and androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5625–5629.
- Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Wittert GA, Tomlinson L, Galletly C, Luscombe ND, Norman RJ: Ghrelin and measures of satiety are altered in polycystic ovary syndrome but not differentially affected by diet composition. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3337–3344.
- Orio F Jr, Lucidi P, Palomba S, Tauchmanova L, Cascella T, Russo T, Zullo F, Colao A, Lombardi G, De Feo P: Circulating ghrelin concentrations in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:942–945.
- Dunaif A: Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: Mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;18:774–800.
- Vrbikova J, Stanicka S, Dvorakova K, Hill M, Vondra K, Bendlova B, Starka L: Metabolic and endocrine effects of treatment with peroral or transdermal oestrogens in conjunction with peroral cyproterone acetate in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2004;150:215–223.
- Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004;19:41–47.
- DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R: Glucose clamp technique: A method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979;237:E214–223.
- Vrbikova J, Hill M, Starka L, Cibula D, Bendlova B, Vondra K, Sulcova J, Snajderova M: The effects of long-term metformin treatment on adrenal and ovarian steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2001;144:619–628.
- Ciampelli M, Fulghesu AM, Cucinelli F, Pavone V, Caruso A, Mancuso S, Lanzone A: Heterogeneity in beta cell activity, hepatic insulin clearance and peripheral insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1997;12:1897–1901.
- Holte J, Bergh T, Berne C, Berglund L, Lithell H: Enhanced early insulin response to glucose in relation to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome and normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1052–1058.
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE: The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001;7:947–953.
- Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001;108:1875–1881.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941–946.
- Jayagopal V, Kilpatrick ES, Jennings PE, Hepburn DA, Atkin SL: The biological variation of testosterone and sex hormone-binding globulin (SHBG) in polycystic ovarian syndrome: Implications for SHBG as a surrogate marker of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1528–1533.

- 35 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* 2004;89:1273–1276.
- 36 Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE: Sexual differentiation, pregnancy, caloric restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 2003;52:268–276.
- 37 Zborowski JV, Talbott EO, Cauley JA: Polycystic ovary syndrome, androgen excess, and the impact on bone. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2001;28:135–151, vii–viii.
- 38 Weigle DS, Cummings DE, Newby PD, Breen PA, Frayo RS, Matthys CC, Callahan HS, Purnell JQ: Roles of leptin and ghrelin in the loss of body weight caused by a low fat, high carbohydrate diet. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1577–1586.
- 39 Fagerberg B, Hulthen LM, Hulthe J: Plasma ghrelin, body fat, insulin resistance, and smoking in clinically healthy men: The atherosclerosis and insulin resistance study. *Metabolism* 2003;52:1460–1463.
- 40 Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, Boyadjian R: Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3997–4000.
- 41 Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S: Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002;51:124–129.
- 42 Adeghate E, Ponery AS: Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 2002;14:555–560.
- 43 Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E: Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5083–5086.
- 44 Choi KM, Lee J, Lee KW, Seo JA, Oh JH, Kim SG, Kim NH, Choi DS, Baik SH: The associations between plasma adiponectin, ghrelin levels and cardiovascular risk factors. *Eur J Endocrinol* 2004;150:715–718.
- 45 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;34:640–645.
- 46 Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ: AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 2004;279:12005–12008.

PUBLIKACE 4

Šrámková D, Bendlová B. Rezistin-klíč k inzulinové rezistenci? DMEV 2002; 5(4): 225-228.

REZISTIN – KLÍČ K INZULINOVÉ REZISTENCI?

RESISTIN – THE KEY TO INSULIN RESISTANCE?

DANIELA ŠRÁMKOVÁ, BĚLA BENDLOVÁ

Endokrinologický ústav v Praze

SOUHRN

Snaha o bližší pochopení souvislosti mezi obezitou a inzulinovou rezistencí podnítila výzkum genů, jejichž exprese je indukovaná během diferenciací adipocytů. Tento výzkum vedl v nedávné době k objevu proteinu, který nevykazoval homologii s žádným známým hormonem, ani jinou signální molekulou. U myší tento protein snižoval účinek inzulínu, proto byl nazván rezistin. Expresí rezistinu je ovlivněna hladinou inzulínu, stimulací sympatického nervového systému i agonisty PPAR γ . Výsledky několika studií jsou bohužel kontroverzní. U lidí se zdá, že je rezistin spíše než tukovou tkání exprimován mononukleárními buňkami. Poslední studie však potvrzuje zvýšenou expresi rezistinu v břišním viscerálním i subkutánním tuku. I když je pravděpodobné, že je rezistin zapojen do regulací glukózového a lipidového metabolismu, otázka jeho skutečné fyziologické role v organismu a případné patofyziologické role v rozvoji obezity a diabetu 2. typu stále čeká na své zodpovězení. Článek poskytuje přehled poznatků, které byly na zvířecích modelech i na souborech lidských jedinců v souvislosti s rezistinem publikovány během posledních dvou let.

Klíčová slova: rezistin - obezita - inzulinová rezistence - diabetes mellitus 2. typu

SUMMARY

The precise mechanism linking increased adiposity to insulin resistance remains unknown. A search for genes that are induced during adipocyte differentiation led to the identification of a unique protein with no homology to any known hormone or other signaling molecule. Based on mice studies observations, the protein was named resistin because of its antagonistic effect on insulin action. The expression of resistin is influenced by insulin, by stimulation of sympathetic nervous system and by PPAR γ agonists. The results of these several studies are controversial. In men the resistin is expressed more likely by mononuclear cells than by adipocytes. However, the most recent study confirmed the increased expression in visceral and abdominal subcutaneous fat. It is probable that resistin is included in regulations of glucose and lipid metabolism, the question regarding its physiological role in the organism as well as the pathophysiological role in the development of obesity and diabetes type 2 remains to be answered. This review summarizes main conclusions of animal and human studies performed on this topic in past two years.

Key words: resistin - obesity - insulin resistance - type 2 diabetes mellitus

Mechanismus, jímž zvýšené množství tělesného tuku vede k rozvoji inzulinové rezistence, je nejasný. Snaha o bližší pochopení této problematiky podnítila výzkum genů, které jsou indukované během diferenciací adipocytů. Tento výzkum vedl v nedávné době k objevu proteinu, který nevykazoval homologii s žádným známým hormonem ani jinou signální molekulou (Steppan et al. 2001 b).

Jak se ukázalo, tento protein je u myší exprimován v adipocytech a jimi je secernován do krevního oběhu.

Intraperitoneální podání proteinu normálním myším vedlo ke zvýšení hladiny krevní glukózy, aniž by se snížila hladina inzulínu. Imunoneutralizace tohoto proteinu anti-imunoglobulinem γ vedla u obézních myší ke zlepšení inzulinového účinku a ke snížení glykémie (Steppan et al. 2001 a). V souladu s tímto pozorováním byly i závěry pokusů provedených za podmínek „in vitro“ (Steppan et al. 2001 a). Tento protein způsobující u myší rezistenci k inzulínu byl proto nazván **rezistin**.

EXPRESÍ REZISTINU

Zkoumání rezistinu u myší ukázalo, že exprese je vyšší v bílém tuku v porovnání s tukem hnědým, dále že zastoupení mRNA vykazuje sexuální dimorfismus (u samičího pohlaví je vyšší než u samčího) a nejvyšší míru exprese vykazuje samičí gonadální tuková tkáň (Steppan et al. 2001 a). Prokázána byla také závislost na nutričním stavu: při hladovění poklesla exprese imunoreaktivního rezistinu do 48 hodin, k jeho opětovnému zvýšení došlo po nasycení nebo po podání inzulínu (Kim et al. 2001).

Bylo pozorováno, že hladiny rezistinu jsou výrazně vyšší u myší obézních, a to jak u genetických modelů obezity (ob/ob a db/db myši), tak u myší s obezitou indukovanou nutričně: poté, co byla myším podávána výživa s vysokým obsahem tuku po dobu osmi týdnů, byl zaznamenán rozvoj obezity, vzestup sérových hladin rezistinu a inzulinová rezistence.

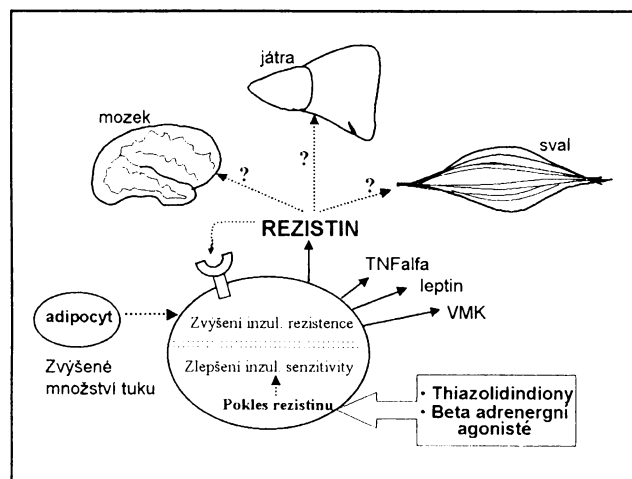
U myši bylo pozorováno, že exprese mRNA pro rezistin je v adipocytech výrazně potlačena agonisty PPAR γ (Way et al. 2001). S tím ve shodě je pozorování, že k inhibici dochází též léčbou antidiabetiky zvyšujícími inzulínovou senzitivitu thiazolidindiony, konkrétně rosiglitazonem, pioglitazonem a troglitazonem (Steppan et al. 2001 a). Po léčbě rosiglitazonem byla u myši výrazně snížena i sekrece rezistinu adipocyty. Lze z toho usuzovat, že antidiabetický efekt těchto léků je alespoň částečně zprostředkovan právě tímto mechanismem.

Na řízení uvolňování rezistinu adipocyty se podílí i sympatický nervový systém prostřednictvím katecholaminů. Byla pozorována inhibice exprese rezistinové mRNA v adipocytech působením β -adrenergního agonisty isoproterenolu, zatímco k opětovnému zvýšení exprese došlo po podání β -adrenergního antagonisty (Fasshauer et al. 2001).

Ve studiích provedených za podmínek „in vitro“ i na živých myších „in vivo“ bylo prokázáno, že rezistin zhoršuje schopnost tukové tkáně reagovat na inzulín. Jak již bylo uvedeno, spotřeba glukózy stimulovaná inzulínem je v tukové tkáni zeslabena podáním rezistinu a naopak zesílila po jeho imunoneutralizaci (Steppan et al. 2001 a). Předpokládá se tedy existence receptoru pro rezistin na povrchu adipocytů. Otázkou zůstává, jak důležitý ve vztahu k inzulínové senzitivě je vliv rezistinu na tkáň svalovou, na játra či na mozek (obr. 1).

STRUKTURA REZISTINU A RELMs, TKÁŇOVĚ SPECIFICKÁ EXPRESE RELMs

Z imunohistochemické analýzy epididymálního tuku vyplynulo, že u myši je rezistin hojný v cytoplazmě adipo-



Obr. 1: Adipocyty secernují mnoho působků, které mohou ovlivňovat citlivost tkání vůči působení inzulínu (TNF α =tumor nekrotizující faktor α , leptin, VMK=volné masné kyseliny a další). Nyní se k nim řadí i rezistin. Nadměrná akumulace tuku v adipocytech souvisí se sníženou schopností tkání reagovat na inzulín. Jak bylo prokázáno ve studiích na myších, také rezistin snižuje schopnost reagovat na inzulín u tukové tkáně, jeho vliv na tkáň svalovou, jaterní či mozkovou zůstává zatím nejasný. K inhibici exprese rezistinu dochází působením antidiabetik thiazolidindienové řady nebo působením β -adrenergních agonistů (upraveno podle Flier et al. 2001).

cytů (Steppan et al. 2001 a). V C-terminální části proteinu byla nalezena unikátní sekvence s bohatým zastoupením cysteinu a ukázalo se, že tato sekvence je konzervovaná u celé rodiny molekul podobných rezistinu (resistin-like molecules, RELMs neboli též FIZZ rodina nazvaná podle anglického „found in inflammatory zone“, neboť byla téměř souběžně detekována u myši trpících plicním zánětem i týmem Holcomba et al.). U myši byly nalezeny tři různé formy těchto molekul, kromě rezistinu (FIZZ 3) ještě RELM α a β . RELM α (FIZZ 1) je protein vyskytující se u myši nejhojněji v tukové tkáni, v malé míře také v srdečním svalu, jazyku a plicích. RELM β (FIZZ 2) je protein secernovaný gastrointestinálním traktem, zejména tlustým stěvem, a to u myši i u člověka (Steppan et al. 2001 b, Holcomb et al. 2000).

Pozoruhodná je struktura proteinů této rodiny, vysoká homologie a konzervace určitých charakteristických znaků v savčím genomu. Již byla zmíněna unikátní sekvence v C-terminální části proteinu. Jde o oblast bohatou na cystein, jehož umístění je naprosto shodné jak u myši, tak u potkanů i u člověka. Přesná posloupnost je: C-X₁₁-C-X₈-C-X-C-X₃-C-X₁₀-C-X-C-X-C-X₉-CC-X₃₋₆ (C=cystein, X=jiná aminokyselina). Předpokládá se jejich uplatnění ve formaci 5 intramolekulárních disulfidických můstků zajišťujících strukturní uspořádání molekuly, a tím její funkčnost, například vazbu na receptor.

Zajímavá je i N-terminální část a zvláště umístění cysteinu v 26. pozici myšního rezistinu. Jak ukázal Banerjee et al., tato aminokyselina je právě v této pozici nepostradatelná pro dimerizaci rezistinu prostřednictvím kovalentní disulfidické vazby. Potvrdil, že proteiny z RELM rodiny nesoou tuto aminokyselinu, tj. rezistin a RELM β , cirkulují ve formě homodimerů, kdežto RELM α , který tento cystein postrádá, je monomer. Pokud se záměrně u rezistinu nebo RELM β substituují cystein za jinou aminokyselinu (Banerjee použil alanin), schopnost dimerizace se tím ruší (Banerjee et al. 2001).

STUDIUM MECHANISMU PŮSOBENÍ REZISTINU, JEHO VLASTNOSTÍ A BIOLOGICKÝCH ÚČINKŮ

Snaha o hlubší poznání mechanismů působení rezistinu vedla mnoho vědeckých týmů k rozsáhlému výzkumu. Některé studie nepotvrzují původní názory na biologické účinky rezistinu: Way et al. dospěl ve studii na modelech obeztních myši (ob/ob, db/db, tub/tub a KKA γ) ke zcela opačným závěrům, že hladiny rezistinu v bílém epididymálním tuku jsou výrazně nižší u myši obeztních než u neobeztních kontrol (15-50krát v závislosti na typu modelu). Snížení exprese mRNA rezistinového genu v bílém tuku bylo pozorováno i u myši s nutričně indukovanou obezitou (Way et al. 2001).

Podobně rozporuplné jsou také závěry z analýz sledujících vliv thiazolidindionů na míru exprese rezistinového genu v bílém tuku myši. Way et al. pozoroval po dodání rosiglitazonu 3.4násobný vzestup exprese rezistinu u ob/ob myši. Stav byl doprovázen snížením hladin glukózy v séru o 50 % a zvýšením citlivosti na inzulín. Obdobná byla také reakce na podávání rosiglitazonu ZDF potkanům (Zucker diabetic fatty rats). Z toho vyplývá, že u těchto modelů inzulínové rezistence není dosažení antidiabetického účinn-

ku rosiglitazonu podmíněno poklesem exprese rezistivního genu (Way et al. 2001).

Byla zkoumána také otázka, zda je hladina rezistivní mRNA přímo ovlivňována působením inzulínu. Na diabetických myších (diabetes navozený streptozotocinem) byla sledována koncentrace rezistivní mRNA v tukové tkáni po podání inzulínu. Byl zaznamenán 2,3násobný vzrůst obsahu rezistivní mRNA po 30 minutách (Kim et al. 2001). Obdobně bylo pozorováno Wayne et al., který testoval vliv inzulínu na expresi rezistinu v bílém tuku u samců ZDF potkanů: po šesti hodinách zaznamenal významné zvýšení exprese (Way et al. 2001).

Další významný poznatek přinesl výzkum provedený na lidských izolovaných tukových buňkách, na vzorcích tukové a svalové tkáně a na mononukleárních leukocytech. Jak uvádí Nagaev et al., rezistin není exprimován v lidské svalové tkáni, exprese v lidských izolovaných adipocytech a biopsiích bílé tukové tkáně je extrémně nízká a měřitelná jen u některých jedinců z testovaného souboru. U všech jedinců však byla prokázána exprese v mononukleárních lymfocytech krve. Studie dále uvádí, že v lidském produktu rezistivního genu nic nenasvědčuje existenci variant vznikajících alternativním sestřihem primárního transkriptu (Nagaev et al. 2001).

Další studii, která příliš nepotvrzuje roli rezistinu jako proteohormonu, který by byl u člověka secernován převážně tukovou tkání, vypracoval Savage et al. Hladiny mRNA rezistinu ve vzorcích tukové tkáně byly sice detekovány u morbidně obézních jedinců, avšak u izolovaných lidských adipocytů byla rezistivní mRNA téměř nedetekovatelná a nevykazovala žádnou korelaci s BMI testovaných osob. Detekována nebyla v izolovaných preadipocytech. Naproti tomu dobře měřitelná byla v cirkulujících mononukleárních buňkách (monocyty, makrofágy, lymfocyty). Možným vysvětlením takového pozorování je podle autora studie větší zastoupení mononukleárních buněk v tukové tkáni morbidně obézních osob (Savage et al. 2001).

Pro to, že rezistin je hojněji exprimován v mononukleárních buňkách nežli v adipocytech, svědčí i fakt, že sekvence odpovídající rezistinu nebyla nalezena v žádné ze 17 cDNA knihoven odvozených z genů aktivních v adipocytech, které byly za tímto účelem podrobeny zkoumání. Tato sekvence byla nalezena v několika cDNA knihovnách odvozených od genů exprimovaných v monocyttech (Savage et al. 2001).

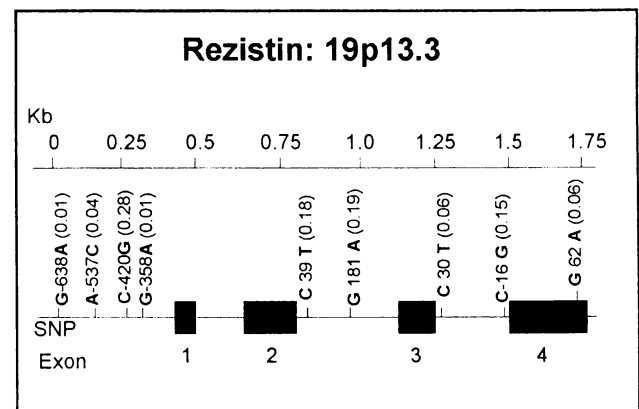
Výsledky výše zmíněných studií nasvědčovaly tomu, že poznatky o rezistinu získané z výzkumu na myších nelze vztahovat na člověka, neboť nepotvrdily významnou sekvenci rezistinu lidskou tukovou tkání. Proto cílem studií, které vypracoval McTernan et al., bylo opětovné vyšetření exprese rezistinu ve vzorcích tuku, tentokrát z různých částí těla u osob štíhlých i obézních, dále vyšetření exprese rezistinu v izolovaných lidských adipocytech a preadipocytech a především spolehlivé ověření toho, zda skutečně za výskyt rezistivní mRNA v tukové tkáni člověka odpovídají mononukleární buňky. Z výzkumu vyplynulo, že rezistivní mRNA je v lidské tukové tkáni exprimována, že její exprese je 2,5krát vyšší v tuku z břišní oblasti v porovnání s tukem stehenním a 6,5krát vyšší v porovnání s tukem prsním. Míra exprese se významně nelišila v břišním tuku viscerálním a subkutánním. Při sledování vztahu mezi kon-

centrací rezistivní mRNA podkožního abdominálního tuku a BMI vyšetřovaných osob bylo zjištěno, že exprese je vyšší u obézních, statistické významnosti však dosaženo nebylo. Při analýze obsahu samotného proteinu rezistinu bylo pozorováno v abdominálním tuku (viscerálním i subkutánním) 2krát vyšší zastoupení než v tuku stehenním či prsním. V izolovaných lidských preadipocytech byla exprese 3krát vyšší než v adipocytech. Toto proteinové zastoupení se dobře shodovalo s naměřenou koncentrací rezistivní mRNA. Nebyly pozorovány žádné intersexuální rozdíly. Za pomoci markeru specifického pro mononukleární krevní buňky (CD 45) bylo ověřeno, že získané výsledky nebyly ovlivněny kontaminací těmito buňkami. Autor uzavírá, že vzhledem k tomu, že tuková tkáň u obézních tvoří až 50 % tělesné hmotnosti, je pravděpodobné, že reprezentuje důležitý zdroj rezistinu v těle obézních osob. Zvýšená exprese rezistinu v břišním viscerálním i subkutánním tuku může souviset se zvýšeným rizikem diabetu 2. typu u centrální obezity (McTernan et al. 2002 a, b).

SEKVENČNÍ VARIANTY V LIDSKÉM GENU PRO REZISTIN

Uvedená poslední pozorování tedy připouštějí možnost, že rezistin a míra jeho exprese může i u člověka být zapojena do etiopatogeneze diabetu 2. typu a obezity.

Kódující sekvence genu pro lidský homolog rezistinu byla lokalizována do oblasti 19p13.3.



Obr. 2: Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) identifikované v genu pro rezistin u člověka. Gen pro rezistin je u člověka lokalizován na krátkém raménku chromozomu 19 a obsahuje čtyři exony (upraveno podle Engert et al. 2002).

Hledání sekvenčních variant v genu pro rezistin vedlo k identifikaci 9 jednonukleotidových polymorfismů (SNPs, obr. 2). Vyšetřovala se jejich případná asociace s diabetem a obezitou. U dvou z nich, které jsou v promotorové oblasti a navzájem jsou v silné vazebné nerovnováze, byla prokázána asociace s BMI u populace z oblasti Quebecu (Engert et al. 2002). Při ověřování těchto SNPs ve skandinávské populaci se asociace s BMI nepotvrdila (Engert et al. 2002). Recentní data však též naznačují jistý synergický efekt sekvenčního polymorfismu rezistivního genu a obezity na riziko vzniku diabetu 2. typu (Ma et al. 2002). K podobným závěrům dospěli i další autoři, kteří prokázali, že SNPs v nekódující oblasti genu determinují index inzulínové senzitivity, ovšem také pouze v interakci s obezitou (Wang et al. 2002).

Předpokládá se, že resistin má receptory na povrchu buněk cílových tkání. V kterých tkáních jsou tyto receptory přítomny, v jakém zastoupení, jaká je struktura těchto receptorů, jak přesně je signalizace inzulínu v tukové tkáni antagonizována signalizací resistinu, jaká je fyziologická role resistinu v organismu a čím je v těchto regulacích specifický organismus lidský - to jsou otázky, které čekají na zodpovězení. Podle posledních poznatků je i u člověka resistin secernován adipocyty a u obézních jedinců představuje adipocytární sekrece významný zdroj resistinu. Je velmi pravděpodobné, že resistin je zapojen do regulací glukózového metabolismu, a tím i do etiopatogeneze diabetu 2. typu. Analýza geneticky podmíněné variability populace ve schopnosti resistin produkovat a reagovat na jeho působení by měla pomoci při zodpovídání těchto otázek, neboť jejich znalost je nezbytná pro případné využití resistinu a jeho funkce v organismu pro léčebné zásahy u lidí trpících diabetem 2. typu.

Podpořeno výzkumným záměrem MZ: 000000023761, IGA MZ ČR NB/5395-5.

LITERATURA

1. Banerjee RR, Lazar MA. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *JBC* 2001; 276: 25970-25973.
2. Engert JC, Vohl MC, Williams SM, Lepage P, Loredó-Osti JC, Faith J, Doré C, Renaud Y, Burttt NP, Villeneuve A, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC, Després JP, Gaudet D, Hudson TJ. 5' Flanking variants of resistin are associated with obesity. *Diabetes* 2002; 51: 1629-1634.
3. Flier JS. The missing link with obesity? *Nature* 2001; 409: 292-293.
4. Kim K, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *JBC* 2001; 276: 11252-11256.
5. Ma X, Warram JH, Trischitta V, Doria A. Genetic variants at the resistin locus and risk of type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 (9): 4407-4410.
6. McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, Crocker J, Barnett AH, Kumar S. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2407-2410.
7. McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S. Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet* 2002; 359: 46-47.
8. Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Comm* 2001; 285: 561-564.
9. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and PPARgamma in humans. *Diabetes* 2001; 50: 2199-2202.
10. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright ChM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-312.
11. Stepan CM, Brown EJ, Wright ChM, Bhat S, Banerjee RR, Dai ChY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD, Lazar MA. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 502-506.
12. Wang H, Chu WS, Hemphill C, Elbein SC. Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 (6): 2520-2524.
13. Way JM, Görgün CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR, Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by PPARgamma agonists. *JBC* 2001; 276: 25651-25653.

*Mgr. Daniela Šrámková
Endokrinologický ústav
Národní 8*

116 94 Praha 1

E-mail: Daniela.Sramkova@email.cz

PUBLIKACE 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**

Metabolic syndrome in young Czech women with polycystic ovary syndrome

J.Vrbíková^{1,4}, K.Vondra¹, D.Cibula², K.Dvořáková¹, S.Stanická¹, D.Šrámková¹, G.Šindelka^{3†}, M.Hill¹, B.Bendlová¹ and J.Škrha³

¹Institute of Endocrinology, Národní 8, Prague 1, 116 94 Czech Republic, ²Department of Obstetrics and Gynecology, Charles University, Apolinářská 28, Prague 2, 120 00 Czech Republic and ³Department of Internal Medicine, Charles University, U Nemocnice 1, Prague 2, 120 00 Czech Republic

⁴To whom correspondence should be addressed. E-mail: jvrbikova@endo.cz

[†]Dr Gustav Šindelka died in 2001.

METHODS: Sixty-nine young women with polycystic ovary syndrome (PCOS) [age 25.2 ± 4.7 years, with body mass index (BMI) 24.3 ± 4.8 kg/m²; mean \pm SD] and 73 age-matched healthy females (BMI 22.3 ± 3.3 kg/m²; mean \pm SD) were evaluated for the occurrence of features of metabolic syndrome according to the Adult Treatment Panel III. **RESULTS:** Overt metabolic syndrome (the presence of three and more risk factors) was not more common in PCOS women (1/64, 1.6%) than in healthy controls (0/73, 0%). On the other hand, in nearly 50% of PCOS women isolated features of metabolic syndrome, most often a decrease in high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, were found. Women with at least one feature of metabolic syndrome were, in comparison with women without any of these features, significantly more obese ($P = 0.0001$), with lower insulin sensitivity ($P = 0.05$). When comparing PCOS women according to the degree of insulin sensitivity, as determined by euglycaemic clamp, isolated features of metabolic syndrome were found in 8/17 women above the upper quartile, compared with 11/16 women below the lower quartile of insulin sensitivity ($P = 0.20$). **CONCLUSIONS:** Overt metabolic syndrome is only rarely encountered in young Czech females affected by PCOS but its isolated features are relatively frequent, both in young PCOS patients and in age-matched control women.

Key words: euglycaemic clamp/insulin resistance/metabolic syndrome/polycystic ovary

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) seems to be the most common endocrine disease in women of reproductive age, with the incidence reported to be about 4–6% in this age group for white women (Knochenhauer *et al.*, 1998; Azziz *et al.*, 2004). In the last two decades of the 20th century, insulin resistance (Dunaif *et al.*, 1989; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 1995; Toprak *et al.*, 2001), dyslipidaemia (Wild *et al.*, 1985; Talbott *et al.*, 1998; Legro *et al.*, 1999, 2001; Dejager *et al.*, 2001; Pirwany *et al.*, 2001) and obesity (Ehrmann *et al.*, 1999; Legro *et al.*, 1999) began commonly to be described as associated with PCOS. These disorders are also the features of the so-called metabolic syndrome or syndrome X, as defined by either the World Health Organization or the Adult Treatment Panel (ATP III) (2001). Insulin resistance is thought to be a core defect in metabolic syndrome, but assessments of neither insulin resistance nor hyperinsulinaemia are among the diagnostic criteria for the syndrome proposed by The National Cholesterol Education Program (NCEP)/ATP III (2001). The exact relationship between insulin resistance and different features of syndrome X is unknown. There is also some discussion as to

whether PCOS itself could be another feature of syndrome X (Sam and Dunaif, 2003).

On the other hand, a surprisingly low number of women with metabolic syndrome have been shown to be affected by PCOS (Korhonen *et al.*, 2001). To date there are few data concerning the prevalence of metabolic syndrome in PCOS women, and these data are mainly derived from the US population (Glueck *et al.*, 2003; Apridonidze *et al.*, 2005), where significantly more women are obese in comparison with European studies.

The authors evaluated a group of young women with PCOS in comparison with age-matched healthy women for the occurrence of various features of metabolic syndrome according to ATP III. A second aim was to describe the mutual relationship of different features of metabolic syndrome to insulin resistance, as examined by euglycaemic hyperinsulinaemic clamp.

Materials and methods

Patients

The study group comprised 69 oligo/amenorrhoeic women with PCOS, evaluated in the years 2001–2003 at either the Department of

Clinical Endocrinology of the Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic or at the endocrine outpatient clinic of the Department of Obstetrics and Gynaecology, Charles University, Prague, and willing to undergo a euglycaemic clamp. All of the subjects matched the Rotterdam consensus criteria (2004), and all had a clinical manifestation of hyperandrogenaemia as hirsutism and/or acne, and an elevation of the free testosterone index and/or androstenedione above the upper limit of the normal range, i.e. 0.40–2.65 nmol/l for testosterone and 1.6–5.4 nmol/l for androstenedione (Vrbiková *et al.*, 2004). Pelvic ultrasound was done using the Siemens Sienna system, (Siemens Medical Solutions, Ultrasound Division, Mountain View, CA, USA), with a 5/7.5 MHz vaginal ultrasound probe. The women were otherwise in good health, without any serious disorders. Women suffering from epilepsy or migraines were excluded, as these are contraindications for the euglycaemic clamp. In all patients 17OH progesterone was determined in the early follicular phase of their cycle, and if levels were between 5 and 10 nmol/l an adrenocorticotrophic hormone test was performed to exclude late-onset congenital adrenal hyperplasia. Hyperprolactinaemia (prolactin level >20 µg/l), hypercortisolism [plasma cortisol >650 nmol/l and, if necessary, urinary free cortisol excretion (normal if <280 nmol/24 h) or a short dexamethasone suppression test with 1 mg of dexamethasone at 22.00–23.00 h and subsequent morning plasma cortisol (normal if <80 nmol/l)], and thyroid dysfunction (euthyroidism defined as both thyroid-stimulating hormone and free thyroxine in normal range) were excluded. None of the patients had taken oral contraceptives or any other medication affecting steroid or glucose metabolism during the preceding 3 months.

The control group consisted of 73 healthy, age-matched females recruited by advertisement, all of whom were in good health with no serious disorders, with a regular menstrual cycle (21–35 days), with no clinical signs of hyperandrogenism and with serum testosterone lower than 2.65 nmol/l. Pelvic ultrasonography was not performed. The patients used no medication.

The local ethics committee of the Institute of Endocrinology approved the protocol of the study and all the patients and controls signed informed consent before the examinations.

The patients and controls were evaluated at the clinical department of the Institute of Endocrinology as outpatients. Two blood pressure readings were obtained in sitting patients after a 10-min rest; the mean was determined from two values and was used for further analysis. Waist circumference was measured in the standing position, halfway between the lower ribs and the crest of the pelvis. Blood sampling for hormonal and biochemical examination was done between days 3 and 6 of the menstrual cycle or, in the case of secondary amenorrhoea, at any time.

Metabolic syndrome was defined using the ATP III criteria (1997), as the presence of three or more of the following features: (i) abdominal

obesity (waist circumference >88 cm); (ii) hypertriglyceridaemia (>1.69 mmol/l); (iii) decrease in high-density lipoprotein (HDL) cholesterol (<1.29 mmol/l); (iv) high blood pressure (≥130/85 mmHg); (v) high fasting blood glucose (≥6.1 mmol/l).

In PCOS patients, after basal blood samples were taken, a 2-h euglycaemic hyperinsulinaemic (1 mIU kg⁻¹ min⁻¹) clamp was performed as described previously (DeFronzo *et al.*, 1979). Insulin sensitivity was determined from the values obtained during the steady-state period, between the 100th and 120th minutes. The target blood glucose level was 5.0 mmol/l, with the coefficient of variance less than 5%. The glucose disposal rate, defined as the amount of glucose supplied by the infusion to maintain the desired blood glucose level (µmol kg⁻¹ min⁻¹), and the insulin sensitivity index (ISI), defined as the ratio of the glucose disposal rate to the average insulin concentration during the observed period (ISI, µmol kg⁻¹ min⁻¹ per mIU l⁻¹ × 100), were calculated on the basis of the clamp results.

Blood glucose was determined in the whole blood by the electrochemical method (Super GL, Dr Muller Gerate Bau, GmBH, Freital Germany). Insulin was estimated by immunoradiometric assay using an immunoradiometric assay kit (Immunotech, Marseilles, France). Total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were assessed by photometry (Ecoline 25; Merck Vitalab Eclipse, Darmstadt, Germany). Testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulphate, LH and sex hormone binding globulin were determined as described previously (Vrbiková *et al.*, 2001).

Statistical evaluation

After confirming a Gaussian distribution, Student's *t*-test was used to evaluate differences between the controls and the PCOS women. Results are presented as mean ± SD. The χ² test or Fisher's exact test was used to compare the frequencies of the particular features of metabolic syndrome between PCOS women and controls.

Results

Clinical parameters

The demographic, anthropometric and biochemical parameters of the healthy and PCOS women are given in Table I. Vaginal pelvic ultrasonography was carried out in 58 PCOS patients. Six showed a normal appearance of the ovaries and 52 had polycystic ovaries (PCO). Five PCOS women had regular menstrual cycles; in 50 women oligomenorrhoea and in 14 secondary amenorrhoea was observed. Body mass index (BMI) in PCOS women was significantly higher than in the controls

Table I. Basic demographic and metabolic parameters in healthy women and women with polycystic ovary syndrome (PCOS)

	Controls (<i>n</i> = 73)	PCOS (<i>n</i> = 69)	<i>P</i>
Age (years)	23.8 (21.8; 26.8)	24.0 (22.0; 28.0)	n.s.
Body mass index (kg/m ²)	21.9 (20.2; 23.6)	23.0 (21.0; 26.9)	0.0097
Waist (cm)	68.2 (65.4; 73.4)	74 (68.5; 80.0)	0.0009
Systolic blood pressure (mmHg)	110.0 (103.3; 118)	118 (110.3; 127.5)	0.003
Diastolic blood pressure (mmHg)	70.0 (65.0; 76.0)	75 (70; 79)	0.02
Cholesterol (mmol/l)	4.08 (3.75; 4.51)	4.44 (4.08; 4.79)	0.01
Triglycerides (mmol/l)	0.79 (0.61; 1.08)	0.86 (0.65; 1.19)	n.s.
HDL cholesterol (mmol/l)	1.48 (1.29; 1.64)	1.37 (1.25; 1.62)	0.04
Fasting blood glucose (mmol/l)	4.5 (4.2; 4.7)	4.6 (4.20; 4.82)	n.s.
Testosterone (nmol/l)	1.83 (1.55; 2.35)	3.38 (2.42; 4.27)	0.00001
Fasting insulin (mIU/l)	6.30 (4.80; 9.28)	8.24 (5.25; 10.05)	n.s.

Values are median (lower quartile; upper quartile).

HDL cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol.

(24.3 ± 4.8 versus 22.3 ± 3.3 kg/m², $P = 0.001$) and all other variables were adjusted for BMI. After BMI adjustment, significantly higher waist circumference ($P = 0.0009$), systolic blood pressure ($P = 0.003$), diastolic blood pressure ($P = 0.02$) and cholesterol ($P = 0.01$) and significantly lower HDL cholesterol ($P = 0.04$) were found in the PCOS women than in controls.

The occurrence of the individual features of metabolic syndrome (according to NCEP/ATP III) in PCOS and controls is given in Table II. No significant difference in the occurrence of any of the features of metabolic syndrome was found between Czech PCOS women and the controls. In PCOS women the following combinations were found: reduction of HDL cholesterol with an increase in waist circumference (two patients), and reduction in HDL cholesterol with elevation of triglycerides (two patients). Other possible combinations were not encountered. Overt metabolic syndrome (higher blood pressure with higher triglycerides and lower HDL cholesterol) was found in only one patient.

To evaluate whether the occurrence of the individual features of metabolic syndrome are different in insulin-sensitive and insulin-resistant PCOS, women were compared on the basis of the degree of insulin sensitivity. Initially, 17 women with ISI below the lower quartile of insulin sensitivity ($44.8 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1} \text{per mIU l}^{-1} \times 100$) were compared with the remaining 52 women. The occurrence of low HDL cholesterol was not significantly different between the groups (33.3 versus 39%), as was also true of abdominal obesity (7 versus 10%), while arterial hypertension occurred in three women in the lower quartile versus one in the rest. When comparing women above the upper and below the lower quartiles of ISI (ISI >80.8 versus <44.8 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1} \text{per mIU l}^{-1} \times 100$), isolated features of metabolic syndrome were found in 8/17 women above the upper quartile as opposed to 11/16 women below the lower quartile ($P = 0.20$; $\chi^2 = 1.59$). Women with at least one feature of metabolic syndrome ($n = 37$) were, in comparison with women free of any of these features ($n = 32$), significantly more obese (BMI 26.0 ± 5.5 versus 22.3 ± 2.4 kg/m²; $P = 0.0001$), with lower insulin sensitivity (52.7 ± 28.5 versus 69.6 ± 25.0 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1} \text{per mIU l}^{-1} \times 100$; $P = 0.05$) and lower testosterone (3.1 ± 1.1 versus 3.8 ± 1.3 nmol/l; $P = 0.03$).

Discussion

In this study, isolated features of metabolic syndrome were no more frequent in young Czech PCOS women than they were in healthy females. The most common abnormality in both groups was a decrease in HDL cholesterol to below 1.3 mmol/l.

In this study, isolated features of metabolic syndrome were much less frequent in young Czech PCOS women than they were in the US population. Czech PCOS data were compared with recently published data from the USA (Apridonidze *et al.*, 2005); it was found that all of the features of metabolic syndrome (with the exception of elevated fasting blood glucose) were significantly more common in the US population than in Czech females.

There is a paucity of data concerning the occurrence of metabolic syndrome in PCOS. A study on the occurrence of metabolic syndrome in women in the USA with PCOS was undertaken in 2003 (Glueck *et al.*, 2003), in which all of the features of metabolic syndrome were found significantly more often in these PCOS women than in the NHANES III white female population; metabolic syndrome was diagnosed in 46% of PCOS women. Recently, a similar study in the US population has confirmed these data; the authors described a prevalence of metabolic syndrome in PCOS women twice as high as that in the general population data (Apridonidze *et al.*, 2005). These results are different from those of the present study; the US population was slightly older (average age 31 versus 24 years), but this is probably of no great importance. Secondly, and more importantly, the US women were significantly more obese (85% with a waist circumference of over 88 cm or BMI between 31.7 and 42 kg/m²).

Higher BMI, waist circumference and systolic and diastolic blood pressures in PCOS women than in controls have already been described; thus, these results accord with those of other studies (Conway *et al.*, 1992; Talbott *et al.*, 1995, 1998). On the other hand, no elevation of any of these parameters above the upper limit of the normal range (Author: as meant?) was found in PCOS women compared with their healthy counterparts. It may thus be speculated that these 'subclinical' risks worsen over time; contrary to this speculation, there are, however, data finding an equal metabolic risk profile between PCOS and healthy women above 40 years (Talbott *et al.*, 1998). An alternative explanation might be that only some PCOS women are susceptible to metabolic syndrome and cardiovascular disease. The most significant difference between PCOS women with and without some features of metabolic syndrome was in the degree of obesity, compared with slight differences in insulin sensitivity. Obesity might thus be considered the most important factor aggravating cardiovascular risks in PCOS women, just as it is in the general population (St-Onge *et al.*, 2004). This speculation is also substantiated by the comparison of data derived from Czech and US women affected with PCOS. Recent studies on metabolic syndrome derived from US data have comprised mostly women with a

Table II. The prevalence of different features of metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome in comparison with control, (Apridonidze *et al.*, 2005)

Features of metabolic syndrome	Prevalence: n (%)			P	
	Controls, Czech ($n = 73$)	PCOS, Czech ($n = 69$)	PCOS, USA ($n = 106$)	PCOS, USA versus PCOS, Czech	Controls, Czech versus PCOS, Czech
Blood pressure >130/85 mmHg	5 (6.85)	9 (13)	48 (45)	0.00001	n.s.
HDL cholesterol < 1.29 mmol/l	18 (24.6)	24 (34.8)	71 (68)	0.0001	n.s.
Waist circumference >88 cm	4 (5.5)	7 (11)	71 (67)	0.00001	n.s.
Triglycerides >1.69 mmol/l	1 (1.4)	4 (5.8)	37 (35)	0.00001	n.s.
Fasting blood glucose > 6.1 mmol/l	1 (1.4)	0	4 (3.8)	ns	n.s.

significant degree of obesity, nearly all of whom have at least one feature of metabolic syndrome, and of whom some 40–50% suffered from overt syndrome. By contrast, Czech PCOS women were mostly lean or only slightly overweight.

In individuals participating in the third national health and nutrition examination survey, (NHANES III), the odds of having metabolic syndrome increase with increasing BMI even in the high-normal range (St-Onge *et al.*, 2004). How this translates to end-point cardiovascular events remains to be verified by long-term prospective studies. In terms of the conversion rate from normal glucose tolerance to diabetes, initial obesity (but not a moderate weight gain during the period of a 4- to 7-year follow-up) was a significant determinant of conversion (Wang and Norman, 2004).

There are some drawbacks to the present study. The control group was defined on the basis of self-reported regular menstrual cyclicality, in connection with normal plasma testosterone and no clinical signs of hyperandrogenism, such as hirsutism, acne or alopecia. Two of the three criteria of the Rotterdam consensus were therefore excluded, but ovarian morphology was not examined. A prevalence of as high as 20% PCO is detected among healthy females (Clayton *et al.*, 1992). On the other hand, females with PCO have been reported as having higher serum testosterone than those with normal ovarian morphology (Adams *et al.*, 2005). The authors detected no bimodal testosterone distribution, and do not therefore believe that there is a substantial proportion of unrecognized PCOS in the control group. The second drawback lies in the fact that the healthy controls were not taken from a random population sample, but rather were recruited by advertisement. Selection bias could therefore affect the results, and it is difficult to judge whether 'healthier' women are more likely to respond to such an advertisement, or if the opposite is true.

In conclusion, overt metabolic syndrome as defined by NCEP/ATP III is only rarely encountered in young Czech females affected by PCOS. The occurrence of the different features of this syndrome in PCOS is no more frequent than in healthy controls, despite the fact that PCOS women have higher average BMI, waist circumference and systolic and diastolic blood pressures than controls. The most commonly encountered abnormality is decreased HDL cholesterol.

Acknowledgements

This study was supported by grant 301/04/1085 of the Grant Agency of the Czech Republic and NB 7391-3 of the Czech Ministry of Health. The authors are grateful for the excellent technical assistance of Mrs R. Bajtlová and Mrs J. Novotná.

References

- (1997) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20,1183–1197.
- (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285,2486–2497.
- (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 19,41–47.
- Adams JM, Taylor AE, Crowley WF Jr and Hall JE (2005) Polycystic ovarian morphology with regular ovulatory cycles: insights into the pathophysiology of polycystic ovarian syndrome. *Obstet Gynecol Surv* 60,239–240.
- Alberti KG and Zimmer PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, 15,539–553.
- Apridonidze T, Essah PA, Iuorno MJ and Nestler JE (2005) Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90,1929–1935.
- Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES and Yildiz BO (2004) The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* 89,2745–2749.
- Clayton RN, Ogden V, Hodgkinson J, Worswick L, Rodin DA, Dyer S and Meade TW (1992) How common are polycystic ovaries in normal women and what is their significance for the fertility of the population? *Clin Endocrinol (Oxf)* 37,127–134.
- Conway GS, Agrawal R, Betteridge DJ and Jacobs, HS (1992) Risk factors for coronary artery disease in lean and obese women with the polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 37,119–125.
- DeFronzo RA, Tobin JD and Andres R. (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237, E214–E223.
- Dejager S, Pichard C, Giral P, Bruckert E, Federspiel MC, Beucler I and Turpin G (2001) Smaller LDL particle size in women with polycystic ovary syndrome compared to controls. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54,455–462.
- Diamanti-Kandarakis E, Mitrakou A, Hennes, MM, Platanissiotis D, Kaklas N, Spina J, Georgiadou E, Hoffmann RG, Kissebah AH and Raptis S (1995) Insulin sensitivity and antiandrogenic therapy in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 44,525–531.
- Dunaif A (1997) Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 18,774–800.
- Dunaif A, Segal KR, Futterweit W and Dobrjansky A (1989) Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 38,1165–1174.
- Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK and Imperial J (1999) Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 22,141–146.
- Glueck CJ, Papanna R, Wang P, Goldenberg N and Sieve-Smith L (2003) Incidence and treatment of metabolic syndrome in newly referred women with confirmed polycystic ovarian syndrome. *Metabolism* 52,908–915.
- Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR and Azziz R (1998) Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 83,3078–3082.
- Korhonen S, Hippeläinen M, Niskanen L, Vanhala M and Saarikoski S (2001) Relationship of the metabolic syndrome and obesity to polycystic ovary syndrome: a controlled, population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 184,289–296.
- Legro RS, Blanche P, Krauss RM and Lobo RA (1999) Alterations in low-density lipoprotein and high-density lipoprotein subclasses among Hispanic women with polycystic ovary syndrome: influence of insulin and genetic factors. *Fertil Steril* 72,990–995.
- Legro RS, Kunesman AR, Dodson WC and Dunaif A (1999) Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women [see comments]. *J Clin Endocrinol Metab* 84,165–169.
- Legro RS, Kunesman AR and Dunaif A (2001) Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Med* 111,607–613.
- Pirwany IR, Fleming R, Greer IA, Packard CJ and Sattar N (2001) Lipids and lipoprotein subfractions in women with PCOS: relationship to metabolic and endocrine parameters. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54,447–453.
- Sam S and Dunaif A (2003) Polycystic ovary syndrome: syndrome XX? *Trends Endocrinol Metab* 14,365–370.
- St-Onge MP, Janssen I and Heymsfield SB (2004) Metabolic syndrome in normal-weight Americans: new definition of the metabolically obese, normal-weight individual. *Diabetes Care* 27,2222–2228.
- Talbott E, Clerici A, Berga, SL, Kuller L, Guzick D, Dettre K, Daniels T and Engberg RA (1998) Adverse lipid and coronary heart disease risk profiles in young women with polycystic ovary syndrome: results of a case-control study. *J Clin Epidemiol* 51,415–422.
- Talbott E, Guzick D, Clerici A, Berga S, Dettre K, Weimer K and Kuller L (1995) Coronary heart disease risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15,821–826.

Metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome

- Toprak S, Yonem A, Cakir B, Guler S, Azal O, Ozata M and Corakci A (2001) Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. *Horm Res* 55,65–70.
- Vrbikova J, Hill M, Starka L, Cibula D, Bendlova B, Vondra K, Sulcova J and Snajderova M (2001) The effects of long-term metformin treatment on adrenal and ovarian steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 144,619–628.
- Vrbikova J, Stanicka S, Dvorakova K, Hill M, Vondra K, Bendlova B and Starka L (2004) Metabolic and endocrine effects of treatment with peroral or transdermal oestrogens in conjunction with peroral cyproterone acetate in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 150,215–223.
- Wang JX and Norman RJ (2004) Risk factors for the deterioration of glucose metabolism in polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online* 9,201–204.
- Wild RA, Painter PC, Coulson PB, Carruth KB and Ranney GB (1985) Lipoprotein lipid concentrations and cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 61,946–951.

Submitted May 14, 2005; resubmitted June 17, 2005; accepted June 29, 2005

PUBLIKACE 6

Šrámková D., Bendlová B., Kunešová M., Hainer V. Gen PPAR γ ve středu zájmu obezitologů a diabetologů. DMEV 2001;4(4):278-286.

GEN PPAR γ VE STŘEDU ZÁJMU OBEZITOLOGŮ A DIABETOLOGŮ

GENE PPAR γ AROUSES INTEREST OF OBESITOLOGISTS AND DIABETOLOGISTS

DANIELA ŠRÁMKOVÁ^{1,2}, MARIE KUNEŠOVÁ³, VOJTĚCH HAINER³, BĚLA BENDLOVÁ¹

¹Endokrinologický ústav, Praha,

²Katedra antropologie a genetiky člověka PŘF UK, Praha

³Centrum pro diagnostiku a léčbu obezity VFN, III. interní klinika 1. LF UK, Praha

SOUHRN

Rodina jaderných receptorů, známých jako receptory aktivované peroxizomovými proliferátory (PPARs), hraje důležitou úlohu v regulaci energetického metabolismu a adipogeneze. Práce shrnuje současné poznatky o zapojení těchto receptorů, zejména typu gama, do složitých metabolických dějů, zvláštní pozornost je věnována glycidovému metabolismu. Uvedeny jsou popsány polymorfismy v genu typu gama a jejich případná souvislost s metabolickými poruchami, jako je obezita a diabetes mellitus 2. typu.

Klíčová slova: peroxizomové proliferátory – PPARs - obezita u člověka - diabetes mellitus 2. typu - genetický polymorfismus - energetický metabolismus

SUMMARY

The family of nuclear receptors, known as peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), plays a key role in energetic metabolism and in a process of adipogenesis. This review summarizes current knowledge about involvement of these receptors, especially the gamma form, in the complex metabolic pathways, with a special attention to carbohydrate metabolism. Gene polymorphisms in gamma form and their possible association with metabolic disorders such as obesity and type 2 diabetes mellitus are presented here.

Key words: peroxisome proliferators – PPARs - human obesity - type 2 diabetes mellitus - gene polymorphism - energy balance

Obezita je definována jako stav patologické akumulace tukové hmoty a v současné době představuje vzrůstající prevalenci jeden z nejzávažnějších zdravotních problémů v rozvinutých zemích a stále častěji i v rozvojových státech. Obézní lidé mají zvýšené riziko hyperinzulinémie, inzulinorezistence a rozvoje diabetu 2. typu, hypertenze, hyperlipidémie, dyslipidémie, hyperurikémie - tedy komplikací popsaných jako Reavenův metabolický syndrom X. Známa je i souvislost mezi otylostí a výskytem některých typů nádorových onemocnění.

Stav současného poznání zcela změnil pohled na tukovou tkáň. Role převážně pasivní zásobárny energie byla nahrazena nanejvýš aktivní rolí regulátoru energetické homeostázy a tělesného složení. Začíná se dokonce hovořit o tukové tkáni jako o metabolicky aktivním orgánu. Byly objeveny geny, jejichž exprese je omezena téměř výhradně na tukovou tkáň nebo je jejich exprese v adipocytech nejvýraznější. Studium těchto genů může přinést informace, které umožní lepší pochopení procesů energetického metabolismu a snad povede i k rozšíření možností léčby obezity a jejich metabolických komplikací.

K těmto genům patří i rodina jaderných receptorů, označovaných jako PPARs.

Receptory aktivované peroxizomovými proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) byly poprvé klonovány jako jaderné receptory, které v procesu genové transkripce přenášejí signál syntetických chemických látek vedoucí k proliferaci peroxizomů. Pokračující výzkum však odhalil, že peroxizomové proliferátory jsou poměrně slabými funkčními aktivátory PPARs v porovnání s nově nalázanými ligandy (viz níže). U člověka navíc není proliferace peroxizomů řízena prostřednictvím PPARs, vžitě pojmenování je tedy z medicínského hlediska nesprávné (Vamecq a Latruffe 1999). V současnosti patří PPARs k jednomu z nejintenzivněji studovaných jaderných receptorů. Zájem ze strany vědců a lékařů vzbudilo zejména zjištění, že PPAR γ hraje klíčovou roli v adipogenezi a dále že mezi jeho syntetické ligandy patří thiazolidindiony, látky úspěšně využívané ke zlepšení citlivosti na inzulin u diabetiků 2. typu.

Postupně se ukázalo, že PPARs jsou obecnými transkripčními faktory nepostradatelnými pro regulaci buněč-

ného cyklu, uplatňujícími se v zánětlivém procesu a v řízení imunitní odpovědi (He et al. 1999), v karcinogenezi (Sarraf et al. 1999) a v aterogenezi (Nagy et al. 1998).

KLASIFIKACE, BIOLOGICKÁ FUNKCE, TKÁŇOVÁ A GENOMOVÁ LOKALIZACE

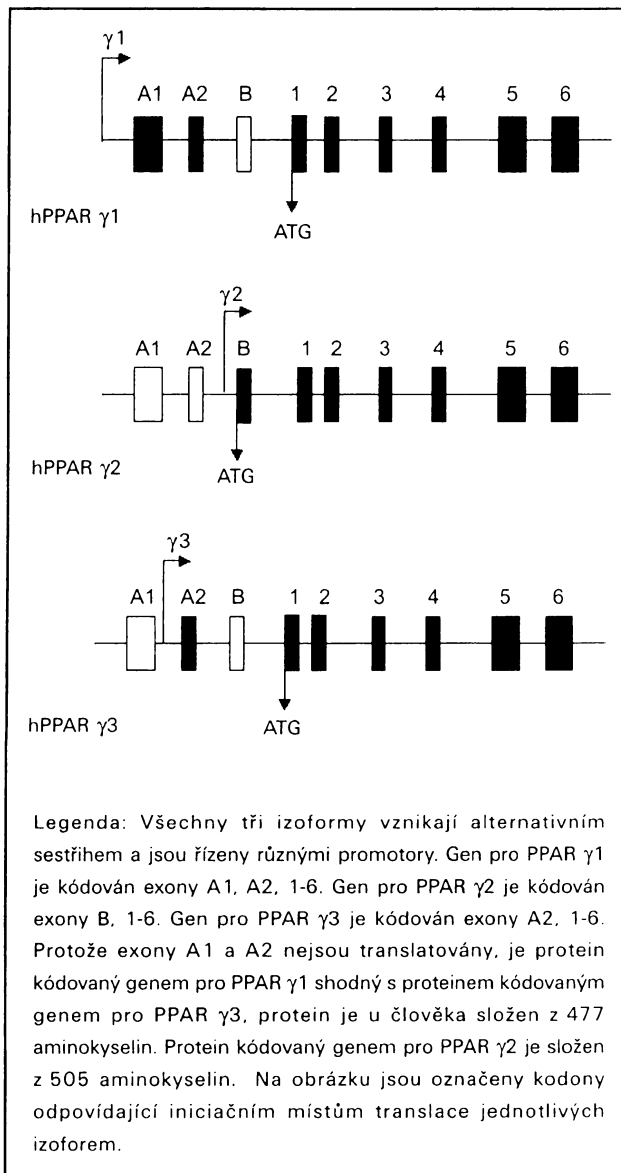
Známý jsou tři typy PPARs: α , dále β (znám též pod názvem δ , NUC-1 či FAAR) a γ , každý je kódován na jiném chromozomu lidského genomu.

Gen pro PPAR α je umístěn v na 22. chromozomu v oblasti 22q13.31. U člověka je exprimován převážně v hnědé tukové tkáni a játrech, dále v ledvinách, srdci a kosterním svalstvu. Cílovými geny PPAR α jsou geny účastníci se lipidového katabolismu, tj. transportu mastných kyselin do buněk, jejich oxidace v mikrozomech, peroxizomech a mitochondriích apod. (Dreyer et al. 1992). Produktem genu je u člověka protein sestávající ze 468 aminokyselin.

Gen pro PPAR β je lokalizován na 6. chromozomu v oblasti 6p21.2-p21.1. Exprimován je u člověka nejsilněji v tlustém střevě a placentě, dále v ledvinách a srdci. Ovlivňuje expresi acetyl-CoA syntázy 2 v mozku (Basu-Modak et al. 1999), je zapojen do procesu embryonální implantace a decidualizace (Lim et al. 1999), je prokázán vztah k rakovině tlustého střeva (He et al. 1999). Protein u člověka sestává z 441 aminokyselin.

Gen pro PPAR γ je u člověka exprimován především v tukové tkáni, dále v tlustém střevě, v menší míře také v kosterních svalech, ledvinách, játrech, tenkém střevě, v buňkách imunitního systému včetně makrofágů pěnových buněk aterosklerotických lézí a v retině (Fajas et al. 1997). PPAR γ je aktivátorem buněčné diferenciace adipocytů. Ve spojení s transkripčními faktory C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins) indukuje PPAR γ diferenciaci pre-adipocytů ve zralé tukové buňky (Rosen et al. 1999). Účinek je zprostředkován geny aktivními v tukové tkáni, k nimž patří geny pro proteiny, zapojenými do regulace množství zásobního tuku a do přenosu signálů ovlivňujících inzulinovou senzitivitu jako např. TNF α (tumor nekrotizující faktor α), LPL (lipoproteinová lipáza), aP2 (adipocyte fatty acid binding protein 2), acetyl-CoA syntáza, FATP (fatty acid transport protein), CPT (karnitin palmitoyltransferáza) nebo PEPCK (fosfoenol pyruvát karboxykináza) (Lowell 1999). Bylo prokázáno, že také PPAR α může indukovat adipogenezi po stimulaci silnými aktivátory, zatímco u PPAR β tato schopnost prokázána nebyla (Brun et al. 1996). Dále se ukazuje, že mutace spojené s poruchou funkce PPAR γ souvisí s nádorovým bujením tlustého střeva (Sarraf et al. 1999), mutace v ligand-dependentní doméně tohoto genu byla v heterozygotní formě prokázána u tří diabetiků 2. typu, u nichž se v neobvykle mladém věku rozvinula hypertenze (Barroso et al. 1999). Pokusy na myších prokázaly nepostradatelnost PPAR γ pro diferenciaci trofoblastu a pro placentární vaskularizaci (Barak et al. 1999). PPAR γ též moduluje diferenciaci makrofágů a ovlivňuje i produkci cytokinů makrofágy (Nagy et al. 1998).

Metodou somatické hybridizace (Greene et al. 1995) a metodou fluorescenční hybridizace in situ (Beamer et al. 1997) byl gen pro PPAR γ lokalizován na 3. chromozomu v oblasti 3p25. Obsahuje 9 exonů a svou délkou přesahu-



Obr. 1: Genomická organizace izoform lidského genu PPAR γ

je 100 kb. Klonování cDNA pro PPAR γ ukázalo, že existují 3 formy: PPAR γ 1, PPAR γ 2 a PPAR γ 3. Všechny tři izoformy vznikají alternativním sestřihem, jsou řízeny různými promotory a mají ligand-dependentní a ligand-independentní aktivační domény. Gen pro PPAR γ 1 je kódován exony A1, A2 a dále exony 1 až 6. Forma PPAR γ 2 je kódována 7 exony, které zahrnují pro tuto formu unikátní exon B a dále exony 1 až 6 společné s PPAR γ 1. Transkript PPAR γ 2 má oproti PPAR γ 1 na 5' konci 84 nukleotidů (28 aminokyselin) navíc, což činí ligand-independentní aktivační doménu této izoformy 5-10krát efektivnější v porovnání s PPAR γ 1 (Werman et al. 1997). Gen pro PPAR γ 3 je kódován kromě exonů 1 až 6 exonem A2, dává však vznik proteinu shodnému s proteinem kódovaným genem pro PPAR γ 1, neboť exony A1 a A2 nejsou translatovány, takže se uplatní pouze exony 1 až 6, kódující protein složený z 477 aminokyselin (obr. 1).

Gen pro PPAR γ 1 je exprimován v mnoha různých tkáních (tuková tkáň, slabě též v kostní dřeni, slezině, ledvinách, játrech, testes, mozku, srdci, kosterních svalech).

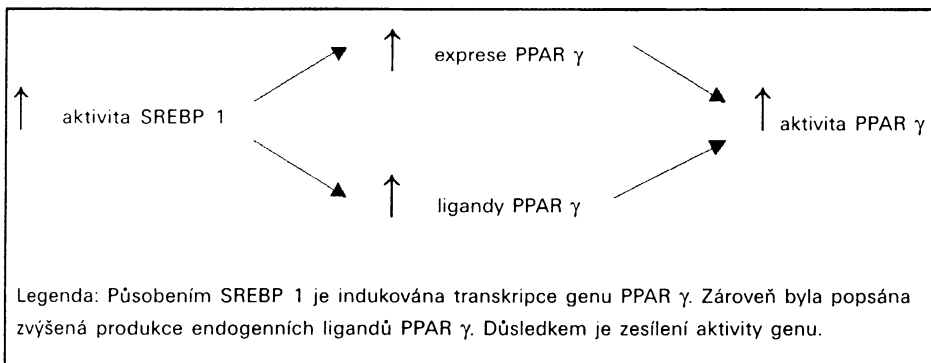
Gen pro PPAR γ 2 je exprimován především v tukové tkáni, ve slabší míře též v kosterních svalech a játrech.

Gen pro PPAR γ 3 je podle dosavadních znalostí exprimován v tlustém střevě a tukové tkáni (Vidal-Puig et al. 1997).

SOUČASNÉ POZNATKY O MECHANISMU PŮSOBENÍ PPARs

PPARs funkčně aktivované některým z ligandů (viz níže) se vážou na specifickou oblast (tzv. hormone response element) v promotoru cílových genů, a modulují tak jejich transkripci. Je velmi pravděpodobné, že různé ligandy vedou po vazbě na týž nukleární receptor k odlišné prostorové konformaci celkového komplexu a právě tato odlišnost umožňuje rozdílnou reaktivitu s dalšími kofaktory a ve svém důsledku obrovskou komplexnost interakcí v procesu genové exprese při jejich současné vysoké specifitě. PPARs se mohou na promotorovou oblast DNA vázat pouze ve formě heterodimeru s retinovým receptorem X (RXR). Pro heterodimer platí, že je schopen spouštět genovou transkripci po vazbě aktivujícího působku na PPAR nebo na RXR, při současné vazbě obou je však transkripce výrazně silnější (Desvergene a Wahli 1999).

Ve stavu sytosti (u člověka do 4 hodin po vydatnějším jídle) je velká část glukózy vychytávána z krevního oběhu játry, využita k syntéze glykogenu a přebytky slouží jako substrát k lipogenezi. Po jídle byl pozorován vzestup SREBP 1 (sterol response element binding protein 1, též ADD 1) a PPAR γ v tukové tkáni. Vztah mezi geny je takový, že působením SREBP 1 je indukována transkripce PPAR γ genu (Fajas et al. 1999). Dále SREBP 1 indukuje expresi několika genů zahrnutých do procesu lipogeneze a předpokládá se, že důsledkem je vzestup produkce přirozených ligandů PPAR γ , a tím zesílení funkční aktivity genu (Kim et al. 1998) (obr. 2).



Obr. 2: Schéma shrnující vztah mezi aktivitou SREBP 1 a PPAR γ

Bylo prokázáno, že transkripce SREBP 1 vede ke konverzi glukózy v acetyl-CoA a následně k syntéze mastných kyselin (Foretz et al. 1999). Mastné kyseliny se vážou na glycerol a ve formě triacylglycerolu se stávají součástí VLDL. Množství SREBP a PPAR γ v tukové tkáni se zvyšuje v postprandiálním stavu. Vzrůst koncentrace proteinu PPAR γ a jeho interakce s příslušnou promotorovou oblastí vede k indukci LPL a FATP. Důsledkem je posílení distribuce mastných kyselin do adipocytů. To přispívá k syntéze TG a jejich akumulaci v tukové tkáni. Předpokládá se, že množství SREBP a PPAR γ je v tukové tkáni v postprandiálním stavu zvyšováno působením inzulínu (Rieusset et al. 1999). Podávání inzulínu diabetickým myším normalizovalo ex-

presi genu pro PPAR γ 1 a γ 2, před podáním inzulínu u nich byla exprese PPAR γ 1 snížena o 60-70 % a exprese genu pro PPAR γ 2 dokonce o 80 % (Vidal-Puig et al. 1996). Inhibiční je naopak vliv inzulínu na expresi genu pro PPAR α v játrech (Steiniger et al. 1994). Zdá se tedy, že inzulín hraje důležitou roli v regulaci genové exprese jednotlivých forem PPARs v konkrétních tkáních: ve stavu sytosti je díky vysokým hladinám inzulínu stimulována exprese PPAR γ v tukové tkáni a zároveň inhibována jaterní exprese PPAR α genu. Za podmínek, kdy je hladina endogenního inzulínu z nějakého důvodu nízká (hladovění, porucha sekrece atp.), exprese PPAR γ a SREBP 1 v adipocytech je slabá, zatímco játra prostřednictvím zvýšení exprese PPAR α genu produkují enzymy účastnící se oxidace mastných kyselin na acetyl-CoA a následně na ketolátky jako acetoacetát a β -hydroxybutyrát, tedy na substrát využitelný pro ostatní tkáně (Kersten et al. 1999).

Do těchto složitých regulací významně zasahuje nedávno objevený proteohormon leptin. Mnoho vědeckých publikací popisuje stimulační vliv inzulínu na sekreci tohoto působku (Sinha a Caro 1998). Nově bylo v podmínkách in vivo potvrzeno, že fyziologický vzestup koncentrace leptinu vede k výrazné inhibici inzulínové sekrece (Cases et al. 2000).

Leptin je kódován ob-genem na 7. lidském chromozomu a skládá se ze 167 aminokyselin. Exprimován je převážně v tukové tkáni adipocyty, v menší míře též epitelem žaludku, placentou a dalšími tkáněmi. Za normálních okolností koreluje výše hladiny leptinu s množstvím tukové tkáně v organismu. Leptin v krvi cirkuluje z větší části vázán na proteiny a ve volné formě působí na hypotalamická centra regulující příjem potravy. Mechanismus účinku je u zdravých osob takový, že zmožnění tukové tkáně se odrazí ve vzestupu

hladin leptinu, což vede k útlumu chuti k jídlu a ke zvýšení energetického výdeje. Naopak případná redukce tukové hmoty a následný pokles koncentrace leptinu v krvi působí na příjem potravy stimulačně, energetický výdej se snižuje. Tento obecný popis je pouze modelový, neboť existuje vysoká heterogenita v koncentraci leptinu u osob téže tělesné konstituce, věku i pohlaví. Hladiny leptinu do značné míry závisí na aktuál-

ní energetické bilanci. Pouze v případě, kdy je tato bilance vyrovnaná, odráží leptin celkové zastoupení tuku v organismu (Levine a Billington 1998).

V souvislosti s tím je zajímavé pozorování, že exprese PPAR γ dokáže účinně snižovat produkci leptinu (Wang et al. 1999 a), a bránit tak leptinem indukované supresi inzulínové sekrece a dále v souladu se svým adipogenním účinkem zabraňuje i zvýšení energetického výdeje, což je proces leptinem stimulovaný. Snížení exprese PPAR γ , např. v důsledku mutace, může vést ke zvýšení hladin leptinu, tím ke snížení potřeby energetického příjmu a snížení tendence k ukládání tukových zásob. Tento efekt může být ještě posílen leptinem potlačenou sekrecí inzulínu. U lidí,

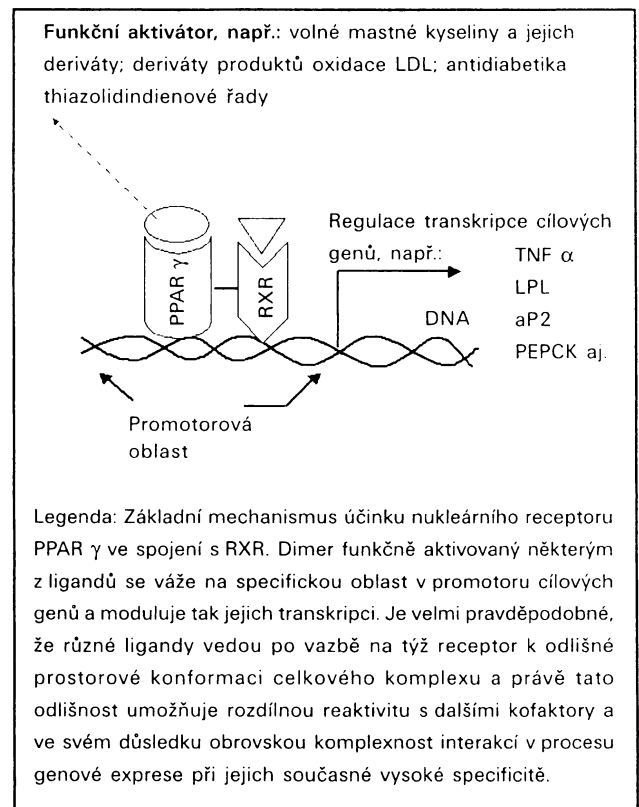
kteří jsou nositeli mutace v genu PPAR γ (Pro 12 Ala), a mají proto v heterozygotní formě méně aktivní alelu genu, byla koncentrace leptinu skutečně statisticky významně vyšší (Vendrell et al. 2000). Vzájemné vztahy mezi PPAR γ a inzulinem osvětlují také studie na myších, jimž byla exprese genů pro PPAR γ záměrně snížena (Kubota et al. 1999, Barak et al. 1999): Heterozygotní PPAR γ -deficientní myši vykazovaly hyperexpresi a hypersekreci leptinu, a to navzdory menší velikosti adipocytů a sníženému množství celkového tělesného tuku. U těchto myší byla zjištěna i ochrana před rozvojem inzulinové rezistence při podávání diety bohaté na tuky (Kubota et al. 1999). Jiná studie na myších heterozygotních pro mutaci znemožňující funkci genu pro PPAR γ (homozygotní výskyt mutace není slučitelný se životem) ukázala snížení hladin inzulinu u těchto myší v porovnání s myši normálními v 0., 15. a 30. minutě oGTT a navíc exogenním inzulinem indukovaný vzestup utilizace glukózy během euglykemického clampu byl u heterozygotních myší významně zvýšen. Také inzulinem indukovaná suprese jaterní produkce glukózy byla u heterozygotních myší signifikantně výraznější (Miles et al. 2000). Tato pozorování vedou k překvapivému závěru: Přestože farmakologicky docílená funkční aktivace genu pro PPAR γ zlepšuje inzulinovou senzitivitu, podobný efekt, tedy zvýšení inzulinové senzitivity, je pozorován též v případech, kdy je aktivita genu pro tento jaderný receptor v důsledku mutace omezená.

LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ AKTIVITU PPARs

Mezi přirozené ligandy a funkční aktivátory PPARs patří mastné kyseliny a jejich deriváty (leukotrieny, některé prostaglandiny), přičemž polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (např. kyselina linolová) se přednostně vážou na PPAR α , efektivním funkčním aktivátorem PPAR γ byl shledán prostaglandin 15-dPGJ2 (Forman et al. 1995, Kliewer et al. 1995). Velmi potentními funkčními aktivátory PPAR γ jsou deriváty produktů oxidace LDL: 9-hydroxy a 13-hydroxy oktadekadienové kyseliny (HODE) a 15-hydroxyeikosatetraenová kyselina (15-HETE) (Nagy et al. 1998). Pokusy v podmínkách in vitro prokázaly synergické stimulační působení inzulinu a kortikosteroidů na expresi PPAR γ v kultuře izolovaných lidských adipocytů (Vidal-Puig et al. 1997). Inzulin potencuje expresi a adipogenní aktivitu PPAR γ 1 i PPAR γ 2 u člověka působením na ligand-independentní aktivační doménu genů (Rieusset et al. 1999). Známa je nepřímá negativní regulace exprese PPAR γ působením prostaglandinu F $_2$ (PGF $_2$) prostřednictvím MAP kináz (Reginato et al. 1998). Mastné kyseliny stimulují expresi genu PPAR β , který ovlivňuje expresi dalších genů, mezi nimi genu pro PPAR γ . Ten navozuje diferenciaci adipocytů. PPAR β tady zasahuje do proliferace buněk navozené mastnými kyselinami (Jehl-Pietri et al. 2000).

K syntetickým ligandům PPAR, zejména PPAR α , se řadí tzv. fibrátové hypolipidemické léky jako bezafibrát, fenofibrát, gemfibrozil a klofibrát. K ligandům PPAR γ patří anti-diabetika thiazolidindienové řady (troglitazon, pioglitazon, rosiglitazon, ciglitazon, englitazon), vliv těchto látek na PPAR α a β je výrazně slabší. Pozornost zasluží poznatek, že thiazolidindiony stimulují diferenciaci preadipocytů,

publikovaný ještě před znalostí souvislosti s PPAR γ (Kletzien et al. 1992). V současnosti je známo, že aktivace PPAR γ prostřednictvím thiazolidindionů vyvolává zvýšení počtu malých adipocytů, o nichž je známo, že jsou v porovnání se staršími tukovými buňkami citlivější na inzulin, přinejmenším hodnotí-li se schopnost glukózového transportu. Toto zjištění přispívá k pochopení mechanismu účinku thiazolidindionů jako farmak zlepšujících inzulinovou senzitivitu. Stimulace formace nových adipocytů spolu s již výše popsáním (kapitola o mechanismu působení PPARs) posílením distribuce mastných kyselin do adipocytů a syntézou TG objasňuje i neblahý důsledek, který je popisován při dlouhodobé léčbě některými farmaky z řady thiazolidindionů, a tím je hmotnostní přírůstek. Zlepšení citlivosti na endogenní inzulin může být dosaženo též působením agonistů RXR, které s PPAR γ tvoří heterodimery.



Obr. 3: Schéma funkce proteinu PPAR γ

POPSANÉ POLYMORFISMY V GENU PRO PPAR γ 2 A JEJICH ASOCIACE S OBEZITOU A DIABETEM 2. TYPU

Protože PPAR γ 2 je transkripčním faktorem s přímým vlivem na diferenciaci adipocytů a zároveň je exprese genu pro PPAR γ 2 ovlivňována nutričním složením, bylo zjišťováno, zda mutace v genu pro tento faktor mají u jejich nositelů spojitost s množstvím zásobního tuku.

Mezi obézními byla pozorována významně vyšší exprese PPAR γ 2, a to u obou pohlaví (Vidal-Puig et al. 1997). V expresi genu pro PPAR γ 1 rozdíly mezi obézními a štíhlymi v téže studii zjištěny nebyly. Silnou pozitivní korelaci vykazoval poměr PPAR γ 2/ PPAR γ 1 ve vztahu k BMI vyšetřovaných osob. U žen byla zaznamenána vyšší exprese genu pro PPAR γ 2 i PPAR γ 1 v porovnání s muži (Vidal-Puig et al. 1997).

V mnoha studiích byla testována souvislost mezi vzácným polymorfismem genu PPAR γ 2 ve 115. kodónu (Pro 115 Gln). Jde o oblast ligand-independentní aktivační domény v 1. exonu genu. Mutace má za následek neustálou aktivitu genu a následné zrychlení diferenciace adipocytů, neboť je znemožněna fosforylace serinu v pozici 114. Právě tato fosforylace vede za normálních okolností k inhibici genové exprese.

Mutace byla v heterozygotním stavu popsána u 4 z 358 vyšetřovaných nepříbuzných jedinců německé národnosti. Všichni nositelé byli těžce obézní s BMI (body mass index) nad 37,9 (Ristow et al. 1998). Širší vliv na prevalenci obezity v evropské populaci však vylučuje extrémní vzácnost popsané mutace. Studie Clementové et al. (2000) nezachytila ani jednoho nositele tohoto polymorfismu v souboru 1069 testovaných, z nichž 626 bylo obézních.

Častější je polymorfismus v pozici 12 (Pro 12 Ala) exonu B genu PPAR γ 2. Je nalézán ve velmi různém frekvenčním zastoupení v závislosti na etnické příslušnosti testovaných jedinců, u evropské populace a u Američanů evropského původu asi ve 12 %, u mexických Američanů v 10 %, u Američanů afrického původu jen ve 3 %. Mutace snižuje transaktivační kapacitu genu, důsledkem je podle některých studií nižší BMI a vyšší inzulinová senzitivita (Deeb et al. 1998). Hara et al. (2000) popisuje snížený výskyt mutace mezi diabetiky 2. typu japonské národnosti oproti kontrolní skupině, navíc mezi osobami s nadváhou nebo obezitou pozoroval u nositelů mutace vyšší inzulinovou senzitivitu. Také Koch et al. (1999) uvádí vyšší citlivost k inzulinu u nositelů mutace ve skupině silně obézních osob. U Američanů japonského původu byla pozorována nižší prevalence diabetu 2. typu u nositelů mutace (Deeb et al. 1998). Některé studie však protektivní vliv mutace nepotvrzují (Mori et al. 1998, Ringel et al. 1999, Mancini et al. 1999, Clement et al. 2000). Beamer et al. (1998) dokonce konstatuje pozitivní korelaci mezi mutací a BMI. Zajímavé jsou závěry Eka et al. (1999), který popisuje vyšší BMI u homozygotních nositelů mutace mezi 752 obézními muži evropského původu, avšak mezi kontrolní neobézní skupinou 869 mužů vykazovali homozygotní nositelé mutace BMI významně nižší.

Známa je dále nemá mutace C1431→T (His 478 His) v exonu 6. Valve et al. (1999) udává její výskyt mezi finskými ženami v 19-21 %, popisuje její asociaci s vyšším BMI a dále uvádí, že ty z nositelek mutace, které zároveň mají v pozici 12 aminokyselinu alanin místo běžného prolinu, trpí významně těžší obezitou v porovnání se ženami bez mutací.

Wang et al. (1999 b) popisuje substituci C161→T v exonu 6 genu PPAR γ 2, její vliv na stupeň obezity nebyl pozorován, mutace je však asociována s vyšším výskytem srdečně-cévních onemocnění.

ZÁVĚR

PPARs je rodina jaderných receptorů, které jsou v současnosti intenzivně studovány. Jde o obecné transkripční faktory nepostradatelné pro regulaci buněčného cyklu, významně se uplatňují v zánětlivém procesu a v řízení imunitní odpovědi, v karcinogenezi a v aterogenezi. Z hlediska obezitologie a diabetologie je nejzajímavější gen pro PPAR

γ , neboť ve spojení s dalšími transkripčními faktory indukuje diferenciaci preadipocytů ve zralé tukové buňky.

V klinických studiích bylo prokázáno, že thiazolidindiony jsou léky, jejichž podávání vede ke zlepšení citlivosti na inzulin u diabetiků 2. typu. Tyto látky byly identifikovány jako vysoce afinitní ligandy nukleárního receptoru PPAR γ , jehož aktivace vede k indukci transkripce genů kontrolujících glukózový a lipidový metabolismus. Omezení aktivity PPAR γ by tedy podle očekávání mělo vést ke zhoršení inzulinové citlivosti. Jak dokazují studie na myších, není tento předpoklad správný, neboť myši s pouze jednou funkční alelou genu vykazovaly větší citlivost k inzulinu než myši kontrolní, a to nejen v periferních tkáních, ale i v játrech. Poznatky, že thiazolidindiony mohou snižovat expresi ob-genu v tukové tkáni (Zhang et al. 1996), dále že exprese PPAR γ tlumí sekreci produktu ob-genu leptinu (Wang et al. 1999a) a že exprese ob-genu, a tedy sekrece leptinu je u lidí s mutovanou alelou a u myši s nefunkční alelou PPAR γ genu zesílena, nasvědčují tomu, že leptin je zapojen do regulací zajišťujících vyrovnanou hladinu glukózy v krvi. Popsané studie na příkladu genu PPAR γ dokazují, že inzulinová senzitivita je regulována mnoha vzájemně se ovlivňujícími geny, kdy nedostatečná exprese jednoho z nich, způsobená například mutací, může vést ve svém důsledku k podobnému efektu, jako farmakologicky prostřednictvím ligandů stimulovaná funkční aktivita téhož genu.

Takové zjištění dobře ilustruje složitost dějů vedoucích k manifestaci multifaktoriálně podmíněných onemocnění, jimiž obezita i diabetes mellitus jsou. Jejich hlubší pochopení může odhalit nové způsoby, jak tyto regulace ovlivnit a přiblížit se tak terapii, působící na jemnějších úrovních, řešící konkrétní zdravotní poruchu jednotlivce s jeho genetickým vybavením v daných životních podmínkách.

Práce na této problematice je podporována grantovými úkoly IGA MZ ČR NB/5395-5, COST OC. B17.10, MZ: 000000023761.

LITERATURA

1. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lonzano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999; 4: 585-595.
2. Barroso I, Gurnell M, Crowley VEF, Agostini M, Schwabel JW, Soos MA, Masien GL, Williams TDM, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VKK, O'Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPAR-gamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999; 402: 880-883.
3. Basu-Modak S, Braissant O, Escher P, Desvergne B, Honegger P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. *J Biol Chem* 1999; 274: 35881-35888.
4. Beamer BA, Negri C, Yen CJ, Gavrillova O, Rumberger JM, Durcan MJ, Yarnall DP, Hawkins AL, Griffin CA, Burns DK, Roth J, Reitman M, Shuldiner AR. Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor-gamma (hPPAR-gamma) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233: 756-759.

5. Beamer B, Yen C, Andersen R, Muller D, Elahi D, Cheskin L, Andres R, Roth J, Shuldiner A. Association of the Pro 12 Ala variant in the peroxisome proliferator activated receptor γ gene with obesity in two Caucasian population. *Diabetes* 1998; 47: 1806-1808.
6. Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* 1996; 10: 974-984.
7. Cases JA, Ma XH, Yang XM, Michaeli T, Fleischer N, Rossetti L, Barzilai N. Physiological increase in leptin markedly inhibits insulin secretion in vivo. The European Association for the Study of Diabetes 2000; Abstract volume of the 36th Annual Meeting: A132, N° 513.
8. Clement K, Hercberg S, Passinge B, Galan P, Varroud-Vial M, Shuldiner AR, Beamer BA, Charpentier G, Guy-Grand B, Froguel P, Vaisse C. The Pro 115 Gln and Pro 12 Ala PPAR gamma gene mutations in obesity and type 2 diabetes. *Int J Obes* 2000; 24: 391-393.
9. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamäki J, Mykkänen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro 12 Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Genet* 1998; 20: 284-287.
10. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20: 649-688.
11. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal β oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptor. *Cell* 1992; 68: 879-887.
12. Ek J, Urhammer SA, Sørensen TIA, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O. Homozygosity of the Pro 12 Ala variant of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (PPAR- γ 2): divergent modulating effect on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 1999; 42: 892-895.
13. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E., Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JCh, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR γ Gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 18779-18789.
14. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5495-5503.
15. Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, Le Liepvre X, Berthelie-Lubrano C, Spiegelman BM, Kim JB, Ferré P, Foufelle F. ADD 1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 3760-3768.
16. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 Is a Ligand For the Adipocyte Determination Factor PPAR Gamma. *Cell* 1995; 83: 803-812.
17. Greene M, Blumberg B, McBride O, Yi H, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer S. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* 1995; 4: 281-299.
18. Hara K, Okada T, Tobe K, Yasuda K, Mori Y, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Satoshi K, Ito Ch, Kadowaki T. The Pro 12 Ala Polymorphism in PPAR γ 2 May Confer Resistance to Type 2 Diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 212-216.
19. He TCh, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999; 99: 335-345.
20. Jehl-Pietri C, Bastie C, Gillot I, Luquet S, Grimaldi P. Peroxisome-proliferator-activated receptor δ mediates the effects of long-chain fatty acids on post-confluent cell proliferation. *Biochem J* 2000; 350: 93-98.
21. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzales FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999; 103: 1489-1498.
22. Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 activates PPAR γ through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4333-4337.
23. Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol* 1992; 41: 393-398.
24. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A Prostaglandin J2 Metabolite Binds Peroxisome Proliferator-activated Receptor and Promotes Adipocyte Differentiation. *Cell* 1995; 83: 813-819.
25. Koch M, Rett K, Maerker E, Volk A, Haist K, Deninger M, Renn W, Häring HU. The PPAR γ 2 amino acid polymorphism Pro 12 Ala is prevalent in offspring of Type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. *Diabetologia* 1999; 42: 758-762.
26. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T. et al.: PPAR mediates high-fat diet induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999; 4: 597-609.
27. Levine AS, Billington ChJ. Do circulating leptin concentrations reflect body adiposity or energy flux? *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 761-762.
28. Lim H, Gupta RA, Ma W, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM, Dey SK. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR. *Genes Dev* 1999; 13: 1561-1574.
29. Lowell BB. PPAR γ : An Essential Regulator of Adipogenesis and Modulator of Fat Cell Function. *Cell* 1999; 99: 239-242.
30. Mancini F, Vaccaro O, Sabatino L, Tufano A, Rivellesse A, Riccardi G, Colantuoni V. Pro 12 Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 is not associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 1466-1468.
31. Miles PDG, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest* 2000; 105: 287-292.
32. Mori Y, Kim-Motoyama H, Katakura T, Yasuda K, Kadowaki H, Beamer B, Shuldiner A, Akanuma Y, Yasaki Y, Kadowaki T. Effect of the Pro 12 Ala variant of the human peroxisome proliferator activated receptor γ gene on adiposity, fat distribution and insulin sensitivity in Japanese men. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 195-198.
33. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* 1998; 93: 229-240.

34. Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST, Lazar MA. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposite effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 1998; 273: 1855-1858.
35. Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D, Roques M, Vallier P, Riou JP, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. *Diabetes* 1999; 48: 699-705.
36. Ringel J, Engeli S, Distler A, Sharma A. Pro 12 Ala PPAR γ 2 missense mutation of the peroxisome proliferator activated receptor γ and diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 450-453.
37. Ristow M, Muller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Eng J Med* 1998; 339: 953-959.
38. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR-gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molec Cell* 1999; 4: 611-617.
39. Sarraf P, Mueller E, Smith WM, Wright HM, Kum JB, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Spiegelman BM, Eng C. Loss-of-function mutations in PPAR-gamma associated with human colon cancer. *Molec Cell* 1999; 3: 799-804.
40. Sinha MK, Caro JF. Clinical aspects of leptin. *Vitam Horm* 1998; 54: 1-30.
41. Steiniger H, Sorensen H, Tugwood J, Skrede S, Spydevold O, Gautvik K. Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady state mRNA level of the peroxisomal proliferator activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty acid induced transcription. *Eur J Biochem* 1994; 25: 967-974.
42. Valve R, Sivenius K, Miettinen R, Pihlajamäki J, Rissanen A, Deeb SS, Auwerx J, Uusitupa M, Laakso M. Two Polymorphisms in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Gene Are Associated with Severe Overweight among Obese Women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3708-3712.
43. Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *The Lancet* 1999; 354: 141-148.
44. Vendrell J, Gutiérrez C, Simón I, Broch M, Vendrell I, Fernández J M, Ricart W, Richart C. Pro 12 Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) is determinant of leptin levels in type 2 diabetes mellitus. *The European Association for the Study of Diabetes 2000; Abstract volume of the 36th Annual Meeting: A89, N° 353.*
45. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenes-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gene Expression in Human Tissues. *J Clin Invest* 1997; 99: 2416-2422.
46. Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman BS, Flier JS, Moller DE. Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 1996; 97: 2553-2561.
47. Wang MY, Lee Y, Unger RH. Novel form of lipolysis induced by leptin. *J Biol Chem* 1999a; 274: 17541-17544.
48. Wang XL, Oosterhof J, Duarte N. Peroxisome proliferator-activated receptor γ C161 \rightarrow T polymorphism and coronary artery disease. *Cardiovascular Research* 1999b; 44: 588-594.
49. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N-terminus of peroxisome proliferator-activated receptor γ : differential activity of PPAR γ -1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem* 1997; 272: 20230-20235.
50. Zhang E, Graziano MP, Doebber TW, Leibowitz MD, White-Carrington S, Szalkowski DM, Hey PJ, Wu M, Cullinan CA, Bailey P, Löllmann FR, Flier JS, Strader CD, Smith RG. Down-regulation of the expression of the obese gene by an antidiabetic thiazolidinedione in Zucker diabetic fatty rats and db/db mice. *J Biol Chem* 1996; 271: 9455-9459.

*Mgr. Daniela Šrámková
Endokrinologický ústav
Národní 8
116 94 Praha 1*

PUBLIKACE 7

Šrámková D., Kunešová M., Hainer V., Hill M., Včelák J., Bendlová B. 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;967:265-273. **IF=1.971**

Is a Pro12Ala Polymorphism of the PPAR γ 2 Gene Related to Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus in the Czech Population?

DANIELA ŠRÁMKOVÁ,^{a,b} MARIE KUNEŠOVÁ,^c VOJTECH HAINER,^c
MARTIN HILL,^a JOSEF VCELÁK,^a AND BELA BENDLOVÁ^a

^a*Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic*

^b*Department of Anthropology and Human Genetics, Natural Science Faculty,
Charles University, Prague, Czech Republic*

^c*Obesity Management Center, Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine
in Prague, Charles University, Prague, Czech Republic*

ABSTRACT: The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear hormone receptor subfamily of transcription factors. PPAR γ 2 plays a key role in regulation of adipocyte differentiation and energy homeostasis. Recent studies provide evidence that the Pro12Ala polymorphism is linked to obesity and type 2 diabetes mellitus, but the results are controversial and depend on ethnicity. The aim of this study was to determine allele frequencies and to study the influence of the polymorphism on biochemical and anthropometric parameters in a Czech healthy adult population, in type 2 diabetics, and in a group of obese women. Results: The frequency of the Pro12Ala PPAR γ 2 gene polymorphism in Czech probands is similar to other central European populations. Frequency of the Pro12Ala substitution tends to be higher in obese women and diabetics compared with controls. The fasting insulin levels in the 12Ala carriers were significantly lower within the group of diabetics even after adjustment for age, BMI, and the length of diabetes duration. In obese women, higher WHR was found in subjects with the 12Ala allele. Conclusions: This study indicates that the substitution Pro12Ala is not associated with a decreased obesity or diabetes risk in the Czech population. However, the present data show that fasting insulin concentrations are lower in diabetics with the 12Ala allele than in those without it. This finding provides evidence that the polymorphism may influence glucose homeostasis.

KEYWORDS: obesity in humans; type 2 diabetes mellitus; PPAR γ 2 gene; Pro12Ala polymorphism

The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ is a member of the nuclear hormone receptor family. This transcription factor has been identified as a functional receptor for the thiazolidinedione class of insulin-sensitizing drugs.¹ The predomi-

Address for correspondence: Mgr. Daniela Šrámková, Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic. Voice: +4202 24905301; fax: +4202 24905325.
Daniela.Sramkova@email.cz

Ann. N.Y. Acad. Sci. 967: 265–273 (2002). © 2002 New York Academy of Sciences.

nantly adipose isoform of PPAR γ , PPAR γ 2, is expressed at a high level in adipose tissue,²⁻⁴ where it modulates the expression of target genes implicated in adipocyte differentiation⁵⁻⁸ and glucose homeostasis. The PPAR γ 2 is therefore a candidate gene for obesity and type 2 diabetes mellitus.

The Pro12Ala polymorphism⁹ was found to lower the transactivation capacity of PPAR γ .^{10,11} This polymorphism occurs with extremely variable frequencies in populations of different ethnic origins.⁹ It has been associated with lower body mass index (BMI) and higher insulin sensitivity in two large Finnish studies and in a group of second-generation Japanese-Americans, in which the 12Ala allele was also less frequent among subjects with type 2 diabetes than among normal controls.¹¹ A large Japanese study suggests that the 12Ala allele may protect from type 2 diabetes mellitus.¹² On the contrary, one study found a positive association with higher BMI in adult Caucasian subjects.¹³ Some studies did not find an association with markers of adiposity and insulin resistance.¹⁴⁻¹⁶

The aim of this study was to determine allele frequencies of the polymorphism and to study the association of allele variants with biochemical and anthropometric parameters in a group of healthy Czech adults, in a group of type 2 diabetes mellitus patients, and in a group of obese women.

METHODS

Study Subjects

We studied the frequency of the Pro12Ala polymorphism in the Czech population in patients with type 2 diabetes mellitus ($n = 183$; age, 59.0 ± 6.2 years; BMI, 30.1 ± 4.8 kg/m²), in a group of obese women ($n = 86$; age, 44.1 ± 11.4 years; BMI, 37.5 ± 5.8 kg/m²), and in a group of healthy adult subjects ($n = 69$; age, 32.6 ± 10.2 years; BMI, 23.9 ± 3.7 kg/m²). (See TABLE 1.)

Type 2 diabetes mellitus patients were diagnosed by criteria of the World Health Organization¹⁷ at the Institute of Endocrinology, Prague. The group of obese women were recruited from the Prague Obesity Management Center. Control probands were volunteers between 20 and 60 years of age without serious health problems. All subjects gave their written informed consent to participate in the study.

Clinical and Anthropometric Characterization

Anthropometric data of the participants were obtained in the fasting state. Body weight, height, and waist and hip circumferences were measured, and the indexes WHR (waist-to-hip ratio) and BMI were calculated in all probands. In the control group, 11 anthropometric height measures, 14 circumferences, 12 width measures, and 14 skin folds were measured, and body composition (% fat mass, % muscles, % bone mass) was calculated using the ANTROPO¹⁸ program. Sitting systolic and diastolic blood pressures were determined in a rest state.

After overnight fast, a venous blood sample was obtained for the determination of a number of biochemical parameters. Blood glucose level was measured by the glucose oxidase method (Beckman Glucose Analyzer 2), whereas glycosylated hemoglobin (HPLC BioRad, Czech Republic) or glycosylated proteins (spectro-

TABLE 1. Characteristics of the study subjects

Group	Number	Age (years) (\pm SD)	BMI (kg/m ²) (\pm SD)
Diabetics	183	59.0 \pm 6.2	30.1 \pm 4.8
Obese	86	44.1 \pm 11.4	37.5 \pm 5.8
Controls	69	32.6 \pm 10.2	23.9 \pm 3.7
Total	338		

photometric redox reaction using nitroblue tetrazolium as a sensitive redox indicator for the specific quantification of fructosamine in alkaline solution) were determined. Immunoreactive insulin (IRI) was assayed in probands not on insulin therapy using an immunoradiometric assay kit (Immunotech IRMA, Czech Republic). Proinsulin was analyzed using the ELISA kit (DRG Diagnostics, Germany). Serum levels of C-peptide were evaluated by the immunoradiometric assay kit (Immunotech IRMA, Czech Republic) and plasmatic glucagon levels were determined using the radioimmunoassay kit (Euro-Diagnostica AB, Sweden). Serum concentrations of total cholesterol (Merckotest, CHOD-PAP-Method), high-density lipoprotein (HDL) cholesterol (Merck System Cholesterin, CHOD-PAP-Method), and triglycerides (TG) (Merck System, GPO-PAP-Method) were measured using an automatic analyzer (Merck, Vitalab Eclipse). Low-density lipoprotein (LDL) cholesterol concentrations were calculated as [LDL = total cholesterol – (TG/5) – HDL]. Radioimmunoassays were used for the determination of growth hormone (Immunotech IRMA, Czech Republic), cortisol (our RIA method), SHBG (Immunotech kit, Czech Republic), and DHEA and DHEA-sulfate (Immunotech kit, Czech Republic). The status of thyroid hormones TSH, free T3, and free T4 was measured using the automatic analyzer Elecsys 2010 (Hitachi-Boehringer Mannheim, Germany). The whole subgroup of control probands underwent 3-h oGTT (oral glucose tolerance test) with 75 g of glucose and ivITT (intravenous insulin tolerance test) according to Young *et al.*¹⁹

Detection of the Pro12Ala Polymorphism of the PPAR γ 2 Using PCR and Hga I Restriction Endonuclease

DNA extracted from peripheral leukocytes was used to genotype for the two variants by the PCR-RFLP method. PCR amplification of the segment with the Pro12Ala polymorphism was carried out in a volume of 15 μ L, containing 15 ng of genomic DNA, 0.5 μ mol of each primer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Takara), and 10 \times PCR buffer received together with Taq DNA polymerase (Top-Bio UNIS); 0.375 U of the enzyme was used.

The PCR conditions were denaturation at 94°C for 2 min followed by 40 cycles of denaturation for 40 s, annealing at 60°C for 40 s, extension at 72°C for 1 min, and final extension at 72°C for 10 min. The following primers²⁰ were used: forward primer 5'-GCCAATCAAGCCCAGTC-3' and reverse primer 5'-CGTCCCCAAT-AGCCGTATC-3'.

The substitution of alanine for proline creates an Hga I restriction site. RFLPs were detected after overnight digestion with 3 U of enzyme. The 12Pro allele gives one 306-bp fragment, whereas the 12Ala allele gives 220-bp and 86-bp fragments.

Statistical Analysis

The χ^2 test was used to assess differences in Pro12Ala frequencies between the group of type 2 diabetes patients, obese women, and controls. For evaluation of the differences in anthropometric and biochemical parameters between the 12Ala carriers and noncarriers, the nonparametric Mann-Whitney test was used. Since there were only four 12Ala homozygotes among all tested probands, they were added to 12Ala heterozygotes and included in the statistical analyses. For evaluation of the differences with adjustment for constant age, BMI, and (in diabetics) the length of diabetes duration, a two-factor ANOVA was used after power transformation of the original data to approximate a Gaussian distribution. The differences were considered statistically significant if $p < 0.05$. Two-tailed p values are reported. Odds ratio and 95% CI were calculated to evaluate the risk of type 2 diabetes and obesity for the 12Ala carriers. To assess insulin resistance and β -cell function, we used the homeostasis model assessment²¹ (HOMA-R and HOMA-F, respectively). Moreover, disposition index²² (DI) was calculated as follows: $DI = HOMA-F \cdot (G_0/I_0)$, where G_0 is fasting serum blood glucose and I_0 is fasting serum insulin.

The tests were done using statistic programs STATGRAPHIC Plus 3.0 (Manugistics, Rockville, MA) and NCS 2000 (Statistical Solutions, Saugus, MA).

RESULTS

Frequency of the Pro12Ala Polymorphism in Czech Type 2 Diabetes Mellitus Patients, Obese Women, and Controls

Detection of the Pro12Ala polymorphism using Hga I restriction endonuclease is shown in FIGURE 1.

Taking all tested probands, the allele frequency of the Pro12Ala polymorphism in the PPAR γ 2 gene was similar to other central European populations.^{23,24} However,

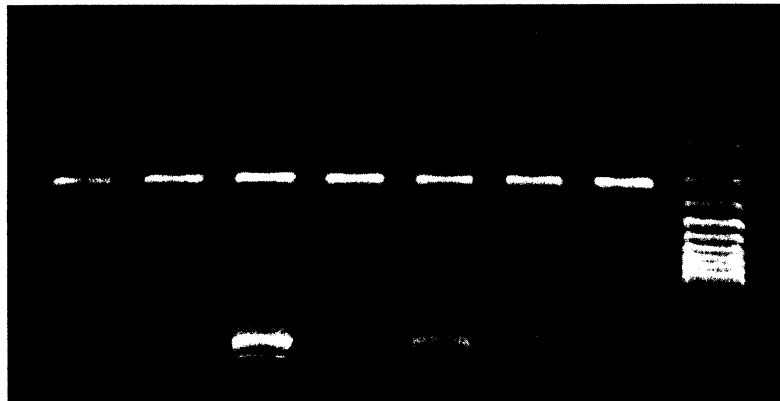


FIGURE 1. Detection of the Pro12Ala polymorphism in the PPAR γ 2 gene using PCR and Hga I restriction endonuclease.

TABLE 2. Frequency of the Pro12Ala polymorphism in the PPAR γ 2 gene in Czech type 2 diabetes mellitus patients, obese women, and controls

Group	Number	12Pro/12Ala	12Ala/12Ala	12Ala allele freq.
Diabetics	183	48 (26.23%)	2 (1.09%)	0.137
Obese	86	25 (29.07%)	1 (1.16%)	0.151
Controls	69	11 (15.94%)	1 (1.45%)	0.087
Total	338	84 (24.85%)	4 (1.18%)	0.130

12Ala tends to be higher in the group of diabetic patients (26.23% of heterozygotes and 1.09% of homozygotes) and obese women (29.07% of heterozygotes and 1.16% of homozygotes) compared with the control group (15.94% of heterozygotes and 1.45% of homozygotes). The difference between the group of diabetics and controls did not reach statistical significance ($\chi^2 = 2.92$, $p = 0.087$), whereas the difference between the obese and controls was stronger ($\chi^2 = 3.68$, $p = 0.055$). (See TABLE 2.)

Comparison of Phenotypic Features in Pro/Ala + Ala/Ala and Pro/Pro Genotypes in Type 2 Diabetes Mellitus Patients, Obese Women, and Controls

The Mann-Whitney nonparametric test revealed significantly lower fasting insulin and C-peptide levels among the 12Ala carriers compared with noncarriers in a group of diabetics (12.98 ± 9.12 vs. 17.16 ± 11.15 , $p = 0.007$; and 0.90 ± 0.91 vs. 0.91 ± 0.43 , $p = 0.037$; respectively). This association between the polymorphism and lower fasting insulin levels in diabetics was confirmed by ANOVA after adjustment for age, BMI, and duration of diabetes ($p = 0.004$). In a group of diabetics, among 12Ala carriers, lower fasting blood glucose levels were detected, although this association disappeared when corrected for age, BMI, and diabetes duration. In terms of anthropometric data, the only statistically significant difference between subjects carrying the 12Ala allele and subjects without it was found in obese women: higher WHR was found in 12Ala carriers (0.88 ± 0.05 vs. 0.85 ± 0.06 , $p = 0.014$). No other differences were found in body composition (BMI, % fat mass, % muscles, % bone mass), nor were any significant differences found in plasmatic lipid levels or in other parameters tested (oGTT and ivITT process, steroid hormone concentrations, etc.), with the only exception being higher TSH levels among 12Ala carriers in comparison with noncarriers in a group of obese women (3.70 ± 2.64 vs. 2.58 ± 1.78 , $p = 0.012$). Odds ratio, HOMA-R, HOMA-F, and DI were not significantly different between subjects with and without the 12Ala allele within any of the diabetic, obese, or control groups. (See TABLES 3 and 4.)

DISCUSSION

The aim of this study was to determine the frequency of the proline to alanine substitution in the human PPAR γ 2 gene in a Czech population and to investigate its impact on glucose and lipid metabolism and susceptibility for type 2 diabetes mellitus and obesity. According to allele frequencies, this study indicates that the substitution is not associated with a decreased risk of type 2 diabetes or obesity. However, the

TABLE 3. Some clinical and anthropometric characteristics of type 2 diabetes mellitus patients and controls in relation to the Pro12Ala polymorphism of the PPAR- γ 2 gene (\pm SD)

Characteristic	Type 2 diabetics (n = 183)			Controls (n = 69)		
	Pro/Pro	Pro/Ala, Ala/Ala	p	Pro/Pro	Pro/Ala, Ala/Ala	p
	51/82	15/35		23/34	4/8	
Sex (M/F)						
WHR	0.92 \pm 0.08	0.90 \pm 0.09	0.098	0.78 \pm 0.08	0.77 \pm 0.06	0.647
Serum blood glucose fasting (mmol/L)	9.30 \pm 3.42	8.19 \pm 3.12	0.045	4.69 \pm 0.48	4.91 \pm 0.71	0.350
Serum insulin fasting (mIU/L)	17.16 \pm 11.15	12.98 \pm 9.12	0.007	7.51 \pm 5.33	8.18 \pm 7.05	0.883
Serum proinsulin fasting (pmol/L)	16.94 \pm 16.58	21.35 \pm 22.21	0.522	3.21 \pm 1.58	3.22 \pm 1.95	0.567
Glycosylated hemoglobin (%Hb)	9.51 \pm 2.34	9.48 \pm 2.79	0.569	6.28 \pm 0.82	6.30 \pm 0.96	0.855
Glycosylated proteins (mmol/L)	1.65 \pm 0.30	1.71 \pm 0.36	0.530	1.11 \pm 0.14	1.10 \pm 0.11	0.968
Serum C-peptide fasting (nmol/L)	0.91 \pm 0.43	0.90 \pm 0.91	0.037	0.65 \pm 0.43	0.59 \pm 0.30	0.657
Total cholesterol (mmol/L)	6.43 \pm 1.30	6.57 \pm 1.43	0.603	4.40 \pm 0.98	4.67 \pm 0.69	0.194
HDL cholesterol (mmol/L)	1.34 \pm 0.39	1.44 \pm 0.38	0.100	1.35 \pm 0.30	1.36 \pm 0.19	0.887
LDL cholesterol (mmol/L)	4.74 \pm 1.06	4.90 \pm 1.26	0.669	2.88 \pm 0.93	3.11 \pm 0.71	0.241
Triglycerides (mmol/L)	2.37 \pm 2.16	2.01 \pm 1.20	0.439	0.83 \pm 0.39	1.00 \pm 0.37	0.130
Growth hormone (mIU/L)	3.33 \pm 3.98	3.60 \pm 4.59	0.923	4.92 \pm 7.79	17.94 \pm 27.02	0.647
Cortisol (nmol/L)	529.61 \pm 230.66	555.46 \pm 199.30	0.490	661.68 \pm 287.52	744.75 \pm 362.47	0.590
SHBG (nmol/L)	30.40 \pm 18.20	33.59 \pm 21.40	0.163	53.33 \pm 43.63	77.67 \pm 61.33	0.082
DHEA-S (μ mol/L)	3.63 \pm 2.17	3.10 \pm 1.63	0.297	6.37 \pm 4.38	5.39 \pm 2.57	0.457
DHEA (nmol/L)	2.86 \pm 1.48	2.97 \pm 2.13	0.746	22.06 \pm 11.84	25.14 \pm 17.08	0.912
TSH (mIU/L)	2.07 \pm 2.29	1.98 \pm 1.38	0.623	2.43 \pm 1.37	2.40 \pm 1.51	0.975
Free T3 (pmol/L)	5.68 \pm 2.01	5.18 \pm 2.04	0.069	5.42 \pm 1.21	4.92 \pm 1.03	0.199
Free T4 (pmol/L)	15.69 \pm 3.00	15.44 \pm 2.84	0.851	15.78 \pm 2.42	15.43 \pm 5.47	0.073

TABLE 4. Some clinical and anthropometric characteristics of obese women and controls in relation to the Pro12Ala polymorphism of the PPAR- γ 2 gene (\pm SD)

Characteristic	Obese (<i>n</i> = 86)			Controls (<i>n</i> = 69)		
	Pro/Pro	Pro/Ala, Ala/Ala	<i>p</i>	Pro/Pro	Pro/Ala, Ala/Ala	<i>p</i>
Sex (M/F)	0/60	0/26		23/34	4/8	
WHR	0.85 \pm 0.06	0.88 \pm 0.05	0.014	0.78 \pm 0.08	0.77 \pm 0.06	0.647
Serum blood glucose fasting (mmol/L)	5.46 \pm 2.00	5.66 \pm 2.39	0.648	4.69 \pm 0.48	4.91 \pm 0.71	0.350
Serum insulin fasting (mIU/L)	13.17 \pm 8.85	15.24 \pm 15.29	0.922	7.51 \pm 5.33	8.18 \pm 7.05	0.883
Serum C-peptide fasting (nmol/L)	1.08 \pm 0.46	1.09 \pm 0.36	0.736	0.65 \pm 0.43	0.59 \pm 0.30	0.657
Total cholesterol (mmol/L)	5.37 \pm 0.85	5.57 \pm 0.95	0.278	4.40 \pm 0.98	4.67 \pm 0.69	0.194
HDL cholesterol (mmol/L)	1.27 \pm 0.31	1.19 \pm 0.32	0.276	1.35 \pm 0.30	1.36 \pm 0.19	0.887
Triglycerides (mmol/L)	1.90 \pm 1.03	1.99 \pm 1.18	0.680	0.83 \pm 0.39	1.00 \pm 0.37	0.130
Growth hormone (mIU/L)	2.45 \pm 4.97	2.25 \pm 5.90	0.750	4.92 \pm 7.79	17.94 \pm 27.02	0.647
SHBG (nmol/L)	49.87 \pm 42.13	43.44 \pm 26.53	0.753	53.33 \pm 43.63	77.67 \pm 61.33	0.082
DHEA-S (μ mol/L)	4.87 \pm 3.06	4.18 \pm 2.30	0.524	6.37 \pm 4.38	5.39 \pm 2.57	0.457
DHEA (nmol/L)	7.18 \pm 5.19	5.92 \pm 3.97	0.327	22.06 \pm 11.84	25.14 \pm 17.08	0.912
TSH (mIU/L)	2.58 \pm 1.78	3.70 \pm 2.64	0.012	2.43 \pm 1.37	2.40 \pm 1.51	0.975

present data show that insulin concentrations are lower in diabetic subjects with the 12Ala allele than in those without it. This finding became even more evident after adjustment for age, BMI, and diabetes duration. These results may indicate that diabetics carrying the 12Ala allele are more insulin-sensitive than those without it, although this suggestion is not supported by significant difference in HOMA-R or DI. Recently, Mori *et al.*²⁵ reported that the 12Ala variant is associated with a lower level of insulin secretion in diabetic subjects and, consequently, with respect to other observations, he concluded that this can be explained by a reduced capacity of pancreas to secrete insulin. This is probably not the case in our study as fasting glucose levels tended to be lower among 12Ala carriers within the diabetic group. It is possible that genetic or environmental²⁶ factors causing diabetes interact with the PPAR γ 2 gene, leading to the differences in insulin sensitivity between subjects with and without Pro12Ala substitution in type 2 diabetes mellitus patients.

Increased insulin sensitivity might to some extent predispose subjects with the 12Ala variant to lipid accumulation under some environmental and genetic backgrounds and our study supports this idea: the 12Ala variant is carried by nearly 30% of individuals in the obese group compared with <16% of control individuals. Moreover, among the obese, the 12Ala carriers have higher WHR. However, we failed to detect any other differences in body composition between subjects with 12Ala and those without it.

In conclusion, the PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism was found to be significantly associated with lower fasting insulin levels among diabetic patients; thus, it is possible that it has influence on insulin sensitivity. Therefore, this polymorphism may have an important impact on glucose homeostasis.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Grant IGA MH NB/5395-5.

REFERENCES

1. LEHMANN, J., L.B. MOORE, T.A. SMITH-OLIVER *et al.* 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J. Biol. Chem.* **270**: 12953–12956.
2. VIDAL-PUIG, A., R.V. CONSIDINE *et al.* 1997. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues: effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* **99**: 2416–2422.
3. FAJAS, L., D. AUBOEUF, E. RASPE *et al.* 1997. Organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J. Biol. Chem.* **272**: 18779–18789.
4. AUBOEUF, D., J. RIEUSSET, L. FAJAS *et al.* 1997. Tissue distribution and quantification of the expression of PPARs and LXR α in humans: no alterations in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* **46**: 1319–1327.
5. SPIEGELMAN, B.M. 1998. PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* **47**: 507–514.
6. TONTONoz, P., E. HU & B.M. SPIEGELMAN. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**: 1147–1156.
7. FORMAN, B.M., P. TONTONoz, J. CHEN *et al.* 1995. 15-Deoxy $\delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* **83**: 803–812.

8. KLIEWER, S.A., J.M. LENHARD, T.M. WILLSON *et al.* 1995. A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**: 813–819.
9. YEN, C.J., B.A. BEAMER, C. NEGRI *et al.* 1997. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor γ (hPPAR γ) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro¹²Ala PPAR γ 2 missense mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**: 270–274.
10. MASUGI, J., Y. TAMORI *et al.* 2000. Inhibitory effect of a proline-to-alanine substitution at codon 12 of peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 on thiazolidine-induced adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**: 178–182.
11. DEEB, S.S., L. FAJAS, M. NEMOTO *et al.* 1998. A Pro 12 Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index, and improved insulin sensitivity. *Nat. Genet.* **20**: 284–287.
12. HARA, K., T. OKADA, K. TOBE *et al.* 2000. The Pro 12 Ala polymorphism in PPAR γ 2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**: 212–216.
13. BEAMER, B., C. YEN, R. ANDERSEN *et al.* 1998. Association of the Pro 12 Ala variant in the peroxisome proliferator activated receptor γ gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* **47**: 1806–1808.
14. MORI, Y., H. KIM-MOTOYAMA, T. KATAKURA *et al.* 1998. Effect of the Pro 12 Ala variant of the human peroxisome proliferator activated receptor γ gene on adiposity, fat distribution, and insulin sensitivity in Japanese men. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**: 195–198.
15. RINGEL, J., S. ENGELI, A. DISTLER *et al.* 1999. Pro 12 Ala PPAR γ 2 missense mutation of the peroxisome proliferator activated receptor γ and diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**: 450–453.
16. MANCINI, F., O. VACCARO, L. SABATINO *et al.* 1999. Pro 12 Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 is not associated with type 2 diabetes. *Diabetes* **48**: 1466–1468.
17. WHO. 1985. Diabetes mellitus: report of a WHO study group. *WHO Tech. Rep. Ser.* **727**: 7–113.
18. BLÁHA, P. 1991. ANTROPO-ein Programm für automatische Beartbeitung anthropologischer Daten. *Wiss. Z. Humboldt-Univ. Berl.* **5**: 153–156.
19. YOUNG, R.P., J.A. CRITCHLEY, P.J. ANDERSON *et al.* 1996. The short insulin tolerance test: feasibility study using venous sampling. *Diabet. Med.* **13**: 429–433.
20. HAMANN, A., H. MÜNZBERG, P. BUTTRON *et al.* 1999. Missense variants in the human peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 gene in lean and obese subjects. *Eur. J. Endocrinol.* **141**: 90–92.
21. MATTHEWS, D.R., J.P. HOSKER, A.S. RUDENSKI *et al.* 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**: 412–419.
22. KAHN, S.E., R.L. PRIGEON, D.K. MCCULLOCH *et al.* 1993. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects: evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* **42**: 1663–1672.
23. POIRIER, O., V. NICAUD, F. CAMBIEN *et al.* 2000. The Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 gene is not associated with post-prandial responses to glucose or fat tolerance tests in young healthy subjects: the European Atherosclerosis Research Study II. *J. Mol. Med.* **78**: 346–351.
24. EVANS, D., J. DE HEER, C. HAGEMANN *et al.* 2001. Association between the P12A and c1431t polymorphisms in the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR gamma) gene and type 2 diabetes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **109**: 151–154.
25. MORI, H., H. Ikegami, Y. Kawaguchi *et al.* 2001. The Pro12 \rightarrow Ala substitution in PPAR- γ is associated with resistance to development of diabetes in the general population. *Diabetes* **50**: 891–894.
26. LUAN, J., P.O. BROWNE, A. HARDING *et al.* 2001. Evidence for gene-nutrient interaction at the PPARgamma locus. *Diabetes* **50**: 686–689.

PUBLIKACE 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**

Od: Tanja Pfeffer-Eckel [eced@staff.uni-marburg.de]

Odesláno: 9. listopadu 2006 16:18

Komu: Bendlová Běla

Předmět: Your manuscript

Dear Dr. Bendlova,

Certainly, your manuscript is here, it is accepted. The official letter will follow as soon as possible. We had severe problems with our systems. We ask you to accept our apologies for the inconvenience caused. We disposed your manuscript for issue 2 next year.

In case of any queries, please do not hesitate to contact me.

Yours sincerely,

T. Pfeffer-Eckel
Editorial Office

Prof. Dr. T. Gudermann
Prof. Dr. P. Nawroth
Editors in Chief

--

ECED Editorial Office
Department of Pharmacology and Toxicology
Philipps University Marburg
Karl-von-Frisch-Str. 1
35043 Marburg

Short title: The UCP1 A-3826G Polymorphism in Czech Population

Full title:

**The UCP1 Gene Polymorphism A-3826G in Relation to DM2 and Body Composition in Czech
Population**

Daniela Sramkova, Sarka Krejbichova, Josef Vcelak, Marketa Vankova, Petra Samalikova, Martin Hill,

Hana Kvasnickova, Katerina Dvorakova, Karel Vondra, Vojtech Hainer, Bela Bendlova

Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

Key words: type 2 diabetes mellitus, uncoupling protein 1, A-3826G polymorphism, insulin sensitivity, obesity in humans

Abbreviations: uncoupling protein (UCP), type 2 diabetes mellitus (DM2), body mass index (BMI), waist to hip ratio (WHR), waist to height ratio (WHeR), disposition index (DI), fasting serum blood glucose (G_0), fasting serum insulin (I_0), oral glucose tolerance test (oGTT), intravenous insulin tolerance test (ivITT), polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Corresponding author: Daniela Sramkova, Institute of Endocrinology, 116 94 Narodni 8, Prague 1, Phone number: +4202 24905301, Fax number: +4202 24905325, E-mail: dsramkova@endo.cz

SUMMARY

Mitochondrial uncoupling contributes to the control of energy expenditure. The brown fat specific uncoupling protein 1 (UCP1) mRNA was detected in intraperitoneal and extraperitoneal adipose tissue in adult humans. The A-3826G polymorphism in the UCP1 gene promoter region was found to be associated with reduced mRNA expression indicating that the polymorphism is of functional importance. *Objective:* To determine allelic frequencies and genotypic distribution of the A-3826G polymorphism and to study its possible association with anthropometric parameters and biochemical markers of glucose and lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus (DM2) patients (n=295), in offsprings of DM2 patients (n=113), and in healthy adults without family history of DM2 (n=120). *Results and discussion:* In the whole cohort of 528 subjects, the G allele was observed with a frequency of 0.26. Genotypic distribution did not differ between diabetics and controls. However, in the offsprings of DM2 patients, significantly higher BMI and a trend towards higher waist to hip ratio, waist to height ratio, waist circumference, and subcutaneous fat mass was observed in the AG genotype compared with the wild-type. Similar tendency was evident in the control group. This indicates possible involvement of the A-3826G polymorphism in the regulation of body composition.

INTRODUCTION

The gene for mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) is expressed in brown fat (Cinti et al., 1989). It belongs to the family of mitochondrial carrier proteins (Cassard et al., 1990). By decreasing the electrochemical gradient over the inner mitochondrial membrane, UCP1 uncouples oxidative phosphorylation, which leads to the production of heat instead of energy storage in the form of ATP (Klingenberg et al., 1990). The thermogenic function of brown fat tissue is under the control of catecholamines acting through adrenoreceptors. As a consequence of norepinephrine binding to the adipocyte plasma membrane, lipolysis is stimulated and non-esterified fatty acids are released. These fatty acids serve as a substrate in the process of brown fat thermogenesis, but they also act as the cytosolic second messengers activating UCP1 (Locke et al., 1982). Although a controversy exists concerning the physiological significance of brown adipose tissue in adults and its possible contribution to body weight control, genetic analysis of various human cohorts suggested a participation of UCP1 in fat tissue content regulation (Fumeron et al., 1996, Heilbronn et al., 2000, Clement et al., 1996, Oppert et al., 1994, Esterbauer et al., 1998). There is a large amount of evidence that brown adipocytes are present and activated in human adults in common nonpathologic and certain pathologic situations (Garruti and Ricquier, 1992, Lean et al., 1986, Ricquier et al., 1982, Zancanaro et al., 1994, Hany et al., 2002, Minotti et al., 2004, van Marken Lichtenbelt et al., 2003, Yang et al., 2003). Hence, disturbed UCP1 function as a result of nucleotide substitution in the regulatory promoter region could represent one of the mechanisms contributing to the complex control of adiposity in humans. A tight functional relationship between central obesity and type 2 diabetes mellitus (DM2) is well established. Therefore, the aim of our study was to determine allelic frequencies and genotypic distribution of the A-3826G polymorphism in a group of Czech adult DM2 patients, offspring of DM2 patients, and in Czech adult healthy non-relative population without family history of DM2. The possible association of the allelic variants with anthropometric parameters and with biochemical markers of glucose tolerance, insulin sensitivity, lipid metabolism and other biochemical features was studied.

STUDY SUBJECTS AND METHODS

We analysed the frequency of the A-3826G polymorphism in 528 adult (older than 20 years) subjects. This cohort included healthy adult individuals without family history of DM2 (n=120, M/F=42/78; age=32.5±11.0 years, BMI=23.3±3.8 kg/m²), DM2 patients (n=295, M/F=112/183; age=58.8±7.0 years, BMI=30.5±5.5 kg/m²), and healthy direct offspring of type 2 diabetics (n=113, M/F=41/72; age=38.2±10.4 years, BMI=25.5±4.2 kg/m²). These offspring were healthy volunteers who had diabetic one or both parents and were not relatives of DM2 patients participating in our study. DM2 patients were diagnosed by criteria of the World Health Organization in the Institute of Endocrinology, Prague. All of them were well compensated either by diet (41.6 %), or by diet and peroral

antidiabetic drugs (53.6 %), or by insulin (18.6 %). The study protocols were in accordance with institutional ethical guidelines and national rules and all the subjects gave their written informed consent to participate in the study.

Anthropometric data were obtained in the fasting state. Body weight, height, waist and hip circumferences were measured in all participants in order to calculate body mass index (BMI) and to evaluate visceral fat accumulation by means of waist circumference, waist to hip ratio (WHR) and waist to height ratio (WHtR). Furthermore, 14 skinfolds were measured in all offspring and controls and in subgroup of the diabetics. Body composition (% of subcutaneous fat mass, % of muscle mass, and % of bone mass from the total body weight) was then calculated using the ANTROPO program (Bláha, 1991).

After an overnight fast, a venous blood samples were obtained in order to determine biochemical parameters. Glucose metabolism was characterized by blood glucose (G_0), glycosylated hemoglobin, glycosylated proteins, proinsulin, C-peptide, and, in probands not on insulin therapy, also by immunoreactive insulin (I_0). Lipid profile was assessed by total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, triglyceride, and low-density lipoprotein cholesterol concentrations. For more detailed subjects characterisation, the determination of leptin, growth hormone, cortisol, sex hormone binding globulin, dehydroepiandrosterone, TSH, free T3, and free T4 were performed. The 24-hour volume of urine was collected and epinephrine, norepinephrine, dopamine, vanillylmandelic acid, homovanillic acid, and hydroxyindoleacetic acid were extracted from these samples and their concentrations were evaluated. The group of offspring and controls underwent the three-hour oral glucose tolerance test (oGTT) with 75g of glucose load and intravenous insulin tolerance test (ivITT) according to Young et al. (Young et al., 1996). To assess insulin sensitivity and β -cell function of the subjects, we used the homeostasis models HOMA R and HOMA F assessment (Matthews et al., 1985) ($HOMA\ R = I_0 * G_0 / 22.5$, $HOMA\ F = 20 * I_0 / (G_0 - 3.5)$). Moreover, disposition index (DI) was calculated as follows (Kahn et al., 1993): $DI = HOMA\ F * (G_0 / I_0)$.

For detection of the A-3826G polymorphism, DNA was extracted from peripheral leucocytes and genotype for the two restriction variants by PCR-RFLP method. PCR amplification of the segment with the A-3826G polymorphism site was carried out in a volume of 12 μ l, containing 20 ng of genomic DNA, 2.9 pmol of each primer, 2.5 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTPs (Takara), 10x PCR Buffer received together with Taq DNA polymerase (Gold 5 U/ μ l, Perkin Elmer); 0.18 units of the enzyme was used.

The PCR conditions were: denaturation at 94°C for 12 min followed by 35 cycles of denaturation for 20 sec, annealing at 62°C for 30 sec, extension at 72°C for 1 min and final extension at 72°C for 10 min. Following primers were used (Valve et al., 1998): forward primer 5'-CCA GTG GTG GCT AAT GAG AGAA-3' and reverse primer 5'-GCA CAA AGA AGA AGC AGA GAGG-3'.

The substitution of G for A abolishes a Bcl I restriction site. RFLPs were detected after 5h digestion in 55°C with 3 U of enzyme. The A allele gives two fragments (157 bp and 122 bp) whereas the G allele gives one 279 bp fragment.

Statistical data treatment: The χ^2 -test was used to assess differences in genotypic distribution between the group of DM2 patients and controls and between the group of offspring and controls (Table 1). As the number of GG homozygotes was not high enough for separate statistical analysis, they were added to heterozygotes and G-allele carriers and non-carriers were compared. Odds ratio and the 95% confidence intervals were calculated to evaluate the risk of DM2 for the G-allele carriers. For evaluation of the relations between G-allele presence and anthropometric as well as biochemical characteristics, the non parametric Mann-Whitney robust test was used in individual subgroups of subjects with different diabetes status. The differences were considered statistically significant if p-level <0,05. Two-tailed p-level values are reported. (Table 2). In addition, the offspring and control group were distributed into subgroups based on quartiles of BMI, WHR, waist circumference, WHeR, and also sc. fat mass content, separately males and females. Then, with respect to the quartile distribution, both genders were analysed together according to genotypic frequencies in the particular quartile subgroups (Table 3).

The statistical analyses were performed using NCSS 2001 software.

RESULTS

The allelic frequency of the A-3826G polymorphism was assessed in the whole cohort of participants. The Hardy-Weinberg expectations were fulfilled in each group. The genotypic distribution was not significantly different between the diabetic and the control group ($\chi^2=2.02$; $p=0.36$) nor between the offspring and the control group ($\chi^2=5.17$; $p=0.07$), see Table 1. The occurrence of the G allele was not associated with increased risk of DM2.

■ indication for Table 1 insertion

Relationships between phenotypic features and the G-allele carriership in the particular groups and genders shows the Table 2. In the control group, slightly higher medians in almost all tested anthropometric parameters (BMI, WHR, WHeR, waist circumference, and subcutaneous fat mass) are apparent in the G-allele carriers, both in males and females. Analyses of biochemical markers of glucose and lipid metabolism revealed no association with the polymorphism in this group.

In a group of offspring of DM2 patients, significantly higher BMI was observed in the G-allele carriers compared with the wild-type, both in males and females. Furthermore, higher WHR, WHeR, waist circumference

and subcutaneous fat mass was evident in the G-allele carriers in both genders. In men these differences were significant. No biochemical markers showed an association with the polymorphism in this group.

In diabetic patients, similarly to controls and offspring, no genotype-related association with any screened biochemical parameter was observed. However, in diabetic women, lower WHR and WHeR were found in the G-allele carriers compared with diabetic women with the AA genotype. The differences in waist circumference and subcutaneous fat mass were also evident. No such a tendency was observed in diabetic men.

■ indication for Table 2 insertion

To widen the analysis of the G-allele association with body composition, controls and offspring were subdivided into subgroups based on quartiles of BMI, on quartiles of WHR, WHeR, and also on quartiles of waist circumference and sc. fat mass content. Then, with respect to the different quartile distribution between genders, men and women were analysed together. Percentage of the G-allele carriers were examined and compared in these quartile subgroups, see Table 3. BMI higher than the 3rd quartile was the most frequent in the G-allele carriers, whereas BMI lower than the 1st quartile was abundant in the AA genotype. Similar genotypic distribution was observed when WHR, waist circumference, WHeR, and sc. fat content was analysed, all χ^2 -statistics were significant or, in case of sc. fat content, of borderline significance.

■ indication for Table 3 insertion

DISCUSSION

Recently, new discoveries about the significance of brown fat have sparked interest in this organ as a potential tool in the fight against obesity in adult humans (Avram et al, 2005). UCP1 protein, exclusively expressed in brown adipocytes, is the mediator of thermogenesis in response to adrenergic stimulation.

This study provided data on the relationship between the UCP1 gene A-3826G promoter region polymorphism and body composition in Czech population. We determined the allelic frequencies and genotypic distributions in 528 Czech probands, 295 of whom were DM2 patients, 113 were direct offspring of DM2 patients, and 120 were healthy controls without family history of DM2. The allelic frequency of the polymorphism in the whole cohort of participants was similar to other Caucasian populations (Oppert et al., 1994, Schaffler et al., 1999). We investigated possible association of the polymorphism with markers of glucose and lipid metabolism and with susceptibility to DM2. In literature, the G variant has been associated with reduced UCP1 mRNA expression

indicating that the polymorphism is of functional importance (Esterbauer et al., 1998). In agreement with this finding, several trials showed that obese women with the G variant were more likely to gain weight over time (Clement et al., 1996, Oppert et al., 1994) and less likely to lose weight (Fumeron et al., 1996). In one study conducted on Australian overweight women, the G variant was reported to increase the susceptibility to obesity (Heilbronn et al., 2000). Furthermore, a greater frequency of the G variant was found in subjects with DM2 and an association was observed between fasting glucose level and the G variant in women with DM2, independently of increased BMI (Heilbronn et al., 2000). On the other hand, some studies did not confirm the association with insulin resistance and DM2 (Schaffler et al., 1999). Thus, the functional impact of this substitution and its association with DM2 and obesity remains an open question deserving further investigation.

Genotypic distribution in our groups of probands demonstrated that the substitution is probably not associated with increased DM2 risk in the Czech population. However, in nondiabetic subjects, G-allele carriers occurred more frequently in the quartile groups with highest levels of BMI, WHR, waist circumference, and WHeR. In support of this finding, in offspring of diabetics higher BMI was observed both in males and females carrying the G-allele compared to the wild-type. Also other anthropometric parameters (WHR, WHeR, waist circumference, subcutaneous fat mass) tended to be higher in offspring carrying the G-allele in comparison with the wild-type. When the G-allele carriers were compared with the wild-type in the group of controls, slightly higher values in anthropometric data were also evident. On the other hand, the G-allele carriers in the group of diabetics do not show higher values in the measured anthropometric parameters. This might be, at least in part, a consequence of drug treatment. A majority of drug-treated diabetics in our group was treated by derivatives of sulfonylurea (66%). It is well known that this treatment can influence body composition (UKPDS 33, 1998). Thus, it is likely that pharmacological intervention interfere with the eventual small effect of the G allele on body mass regulation.

The present findings should be interpreted within the context of their limitations. Our study population was anthropometrically and biochemically well characterized but, for genetic studies, it was relatively small when organised into three subgroups analysed separately: diabetics, offspring of diabetics, and controls. Despite this known limitation, we have demonstrated that the G-allele carriers of the UCP1 gene promoter polymorphism A-3826G are the most frequent in quartile groups with the highest BMI, WHR, waist circumference, and WHeR in the offspring and control group. Furthermore, the G-allele carriers have significantly higher body mass index than the wild-type in offspring group. This could indicate the possible impact of the polymorphism on body mass regulation. This effect is more apparent in individuals exposed to genetic load predisposing to DM2.

Acknowledgements: This study was supported by grant COST OC 17.10, IGA MHCR NR/7809-5

REFERENCES

- Avram AS, Avram MM, James WD: Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J Am Acad Dermatol.* 2005 Oct;53(4):671-83. Review.
- Bláha P. ANTROPO-ein Programm für automatische Bearbeitung anthropologischer Daten. *Wiss. Zeitschrift der Humboldt-Universität zu Berlin* 1991; 5: 153-156.
- Cassard AM, Bouillaud F, Mattei MG, Hentz E, Raimbault S, Thomas M, Ricquier D: Human uncoupling protein gene: structure, comparison with rat gene, and assignment to the long arm of chromosome 4. *J Cell Biochem* 1990; 43: 255-64.
- Cinti S, Zancanaro C, Sbarbati A, Cicolini M, Vogel P, Ricquier D, Fakan S: Immunoelectron microscopical identification of the uncoupling protein in brown adipose tissue mitochondria. *Biol Cell* 1989; 67: 359-62.
- Clement K, Ruiz J, Cassard-Doulier AM, Bouillaud F, Ricquier D, Basdevant A, Guy-Grand B, Froguel P: Additive effect of A→G (-3826) variant of the uncoupling protein gene and the Trp64Arg mutation of the beta 3-adrenergic receptor gene on weight gain in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20: 1062-1066.
- Esterbauer H, Oberkofler H, Liu YM, Breban D, Hell E, Krempler F, Patsch W: Uncoupling protein-1 mRNA expression in obese human subjects: the role of sequence variations at the uncoupling protein-1 gene locus. *J Lipid Res* 1998; 39: 834-844.
- Fumeron F, Durack-Bown I, Betoulle D, Cassard-Doulier AM, Tuzet S, Bouillaud F, Melchior JC, Ricquier D, Apfelbaum M: Polymorphisms of uncoupling protein (UCP) and beta-3 adrenoceptor genes in obese people submitted to a low-calorie diet. *J Obesity Relat Metab Disorders* 1996; 20: 1051-1054.
- Garruti G, Ricquier D: Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992; 16: 383-90.
- Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, von Schulthess GK: Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2002 Oct;29(10):1393-8. Epub 2002 Aug 8.
- Heilbronn LK, Kind KL, Pancewicz E, Morris AM, Noakes M, Clifton PM: Association of -3826G variant in uncoupling protein-1 with increased BMI in overweight Australian women. *Diabetologia* 2000; 43: 242-244.
- Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, Neifing JL, Ward WK, Beard JC, Palmer JP: Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 1993; 42: 1663-1672.
- Klingenberg M: Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *Trends Biochem Sci* 1990; 15: 108-12.

Lean MEJ, James WPT, Jennings G, Trayhurn P: Brown adipose tissue uncoupling protein content in human infants, children and adults. *Clin Sci* 1986; 71: 291-7.

Locke RM, Rial E, Scott ID, Nicholls DG: Fatty acids as acute regulators of the proton conductance of hamster brown-fat mitochondria. *Eur J Biochem* 1982; 129: 373-380.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419.

Minotti AJ, Shah L, Keller K: Positron emission tomography/computed tomography fusion imaging in brown adipose tissue. *Clin Nucl Med*. 2004 Jan;29(1):5-11.

Oppert JM, Vohl MC, Chagnon M, Dionne FT, Cassard-Doulcier AM, Ricquier D, Perusse L, Bouchard C: DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. *Int J Obesity Relat Metab Disorders* 1994; 18: 526-531.

Ricquier D, Nechad M, Mory G: Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 803-7.

Schaffler A, Palitzsch KD, Watzlawek E, Drobnik W, Schwer H, Scholmerich J, Schmitz G: Frequency and significance of the A→G (-3826) polymorphism in the promoter of the gene for uncoupling protein-1 with regard to metabolic parameters and adipocyte transcription factor binding in a large population-based Caucasian cohort. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 770-779.

United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complication in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The Lancet* 1998;352:837-853.

Valve R, Heikkinen S, Rissanen A, Laakso M, Uusitupa M: Synergistic effect of polymorphisms in uncoupling protein-1 and beta(3)-adrenergic receptor genes on basal metabolic rate in obese Finns. *Diabetologia* 1998; 41: 357-361.

van Marken Lichtenbelt WD, Daanen HA: Cold-induced metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003 Jul;6(4):469-75. Yang X, Enerback S, Smith U: Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res*. 2003 Oct;11(10):1182-91.

Young RP, Critchley JA, Anderson PJ, Lau MS, Lee KK, Chan JC: The short insulin tolerance test: feasibility study using venous sampling. *Diabet. Med* 1996; 13: 429-33.

Zancanaro C, Pelosi G, Accordini C, Balercia G, Sbabo L, Cinti S: Immunohistochemical identification of the uncoupling protein in human hibernoma. *Biol Cell* 1994; 80: 75-8.

TABLE 1. Allelic Distribution and Frequency of the UCP1 gene A-3826G Polymorphism in Controls, Offspring, and DM2 Patients

Group	A-3826A	A-3826G	G-3826G	G allele freq.
Controls	61 (50.83%)	49 (40.83%)	10 (8.33%)	0.29
Offspring	60 (53.10%)	51 (45.13%)	2 (1.77%)	0.24
Diabetics	157 (53.22%)	124 (42.03%)	14 (4.75%)	0.26
Total	278 (52.65%)	224 (42.42%)	26 (4.92%)	0.26

TABLE 2. Relationships between Anthropometric Characteristics and G-allele Presence

	women				men								
	AA		AG or GG		AA		AG or GG		P				
	n	mean±SD median	n	mean±SD median	n	mean±SD median	n	mean±SD median					
controls													
BMI(kg/m ²)	40	22.9±3.8	22.3	36	24.1±4.6	22.9	21	23.1±2.6	22.6	20	23.0±3.4	23.3	0.825
WHR	40	0.73±0.07	0.72	36	0.76±0.07	0.74	21	0.82±0.05	0.82	20	0.83±0.05	0.82	0.473
WHeR	40	0.43±0.06	0.41	36	0.45±0.07	0.44	21	0.44±0.04	0.43	20	0.45±0.05	0.46	0.315
Waist(cm)	40	72.1±9.5	69.8	36	75.8±10.2	72.7	21	80.1±8.0	79.0	20	81.9±8.7	83.5	0.382
Sc.Fat(%)	40	24.2±7.3	23.8	36	25.3±8.3	24.0	21	13.9±4.9	13.4	20	17.8±7.5	17.6	0.076
offspring													
BMI(kg/m ²)	41	23.9±3.7	22.8	31	26.0±4.2	26.2	19	24.9±3.3	25.9	20	28.5±4.3	28.1	0.014
WHR	41	0.76±0.06	0.75	31	0.77±0.07	0.76	18	0.87±0.07	0.86	20	0.93±0.08	0.95	0.027
WHeR	41	0.46±0.06	0.45	31	0.48±0.07	0.47	18	0.48±0.06	0.48	20	0.54±0.08	0.55	0.015
Waist(cm)	41	76.3±9.9	74.1	31	80.3±11.5	79.6	18	87.8±11.0	86.8	20	95.9±13.3	96.8	0.045
Sc.Fat(%)	40	25.1±7.5	24.4	30	26.6±6.6	26.6	17	16.2±6.7	13.9	18	21.7±7.8	19.7	0.018
diabetics													
BMI(kg/m ²)	97	31.4±5.0	31.0	80	31.3±7.2	30.3	53	28.7±3.8	28.4	56	29.7±4.4	29.5	0.169
WHR	99	0.91±0.08	0.89	80	0.85±0.08	0.87	53	0.96±0.08	0.96	55	0.97±0.06	0.98	0.450
WHeR	97	0.65±0.08	0.63	80	0.62±0.10	0.61	53	0.60±0.06	0.59	55	0.61±0.08	0.61	0.193
Waist(cm)	99	104.5±12.6	105.0	80	100.8±14.5	100.0	53	104.1±10.5	103.0	55	106.7±13.0	106.0	0.155
Sc.Fat(%)	6	26.5±4.2	26.1	6	33.4±5.6	33.9	8	17.4±5.8	17.6	10	19.3±6.7	19.1	0.564

TABLE 3. G-carriership in Relation to Quartile Subgroups of BMI, WHR, Waist Circumference, Waist to Height Ratio, and Sc. Fat Mass in Nondiabetic Subjects

	G-carriership	<1 st quartile	1 st -2 nd quartile	2 nd -3 rd quartile	>3 rd quartile	
BMI (kg/m ²)	AA	17.5%	13.6%	11.4%	10.5%	$\chi^2=10.32$
	AG or GG	7.5%	11.8%	13.6%	14.0%	p=0.016
WHR	AA	15.9%	15.0%	13.2%	8.9%	$\chi^2=10.62$
	AG or GG	8.8%	10.1%	12.3%	15.8%	p=0.014
Waist (cm)	AA	15.0%	15.9%	13.2%	8.7%	$\chi^2=9.97$
	AG or GG	9.7%	9.7%	11.9%	16.0%	p=0.019
WHeR	AA	16.7%	16.3%	11.0%	8.8%	$\chi^2=16.30$
	AG or GG	7.9%	9.3%	14.1%	15.9%	p=0.001
Sc. Fat (%)	AA	16.2%	14.0%	13.5%	9.5%	$\chi^2=7.79$
	AG or GG	8.6%	11.7%	11.7%	14.9%	p=0.050

PUBLIKACE 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.

ALTEROVANÉ DRASELNÉ KANÁLY BETA BUNĚK A JEJICH ROLE V PATOGENEZI DIABETES MELLITUS 2. TYPU

ALTERED BETA CELL POTASSIUM CHANNELS AND THEIR ROLE IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS

DANIELA ŠRÁMKOVÁ, BĚLA BENDLOVÁ

Endokrinologický ústav, Praha

SOUHRN

Diabetes mellitus 2. typu (DM2) je heterogenní onemocnění, na jehož rozvoji se podílejí genetické faktory i vnější prostředí. Přes značné úsilí, které je mapování genetického pozadí DM2 věnováno, nejsou genetické příčiny nejběžnějších forem diabetu objasněny. V posledních letech je v souvislosti s DM2 věnována velká pozornost draselným kanálům pankreatických beta buněk, neboť hrají stěžejní úlohu v regulaci inzulinové sekrece. Článek shrnuje poznatky o struktuře a funkci draselných kanálů se zaměřením na jejich zapojení do etiopatogeneze DM2. Zvláštní pozornost je věnována polymorfismu E23K, který je považován za jeden z nejvýznamnějších genetických rizikových faktorů, které byly v souvislosti s DM2 dosud odhaleny.

Klíčová slova: diabetes mellitus 2. typu, draselný kanál, polymorfismus E23K, pankreatická beta buňka

SUMMARY

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is generally perceived as a heterogeneous polygenic disorder influenced by both hereditary and environmental factors. Despite intensive investigations, little progress has been made in identifying genes that impart susceptibility to the common late-onset forms of the disease. Recently, genes encoding for components of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta cells have been widely considered as DM2 targets. These channels control insulin secretion by coupling metabolism to membrane electrical activity. The article summarizes knowledge concerning structure and function of the channels with respect to DM2. A common E23K polymorphism in the pore-forming subunit of the channels, which belongs to the most important genetic risk factors for DM2 yet identified, is discussed here.

Key words: type 2 diabetes mellitus, inwardly rectifying potassium channel, E23K polymorphism, pancreatic beta cell

Úvod

Diabetes mellitus 2. typu (DM2) dnes patří k nejrozšířenějším civilizačním chorobám, v západních státech postihuje okolo 3-4 % populace. Výskyt tohoto onemocnění stoupá s věkem a se vzrůstajícím počtem obézních lidí. Jde o heterogenní onemocnění, při němž dochází k poruše glukózového metabolismu, jejímž důsledkem je hyperglykemie. DM2 je silně geneticky podmíněn, svědčí o tom jeho častý familiární výskyt či studie monozygotních dvojčat (Groop et al. 1996, Groop 1997). Individuální riziko vzniku onemocnění je dáno interakcí genetických faktorů a vlivu prostředí. I přes značné úsilí, které je této problematice věnováno, nejsou genetické

příčiny nejběžnějších forem diabetu objasněny (McCarthy et al. 1994). Obtíže genetického výzkumu DM2 plynou také z nejasné primární příčiny hyperglykemie. Místem primárního defektu může být přímo beta buňka a narušená je pak inzulinová sekrece, dále může být primární porucha v působení inzulinu (Turner et al. 1989, DeFronzo et al. 1992, LeRoith 2002) nebo může být hyperglykemie způsobena zvýšenou produkcí glukózy játry. DM2 propuká většinou tehdy, když sekreční kapacita beta buněk již nestačí kompenzovat inzulinovou rezistenci. Genetické studie DM2 se v současné době zaměřují na identifikaci tzv. kandidátních genů, které ovlivňují predispozici jednotlivce k DM2. Tyto geny lze obvykle předpovědět na základě známé biochemické

funkce nebo jsou odvozeny ze zvířecích modelů. Jakmile je vybrán kandidátní gen, jsou hledány jeho genetické varianty, často jednonukleotidové polymorfismy. I když již bylo ve vztahu k DM2 studováno více než 200 kandidátních genů, výsledky nejsou zatím příliš povzbudivé. Opakovaně však byla potvrzena asociace DM2 s polymorfismem genu, který kóduje jednu z buněčných struktur nepostradatelnou pro správnou regulaci inzulínové sekrece, tzv. Kir6.2 podjednotku buněčných draselných kanálů (Gloyn 2003a).

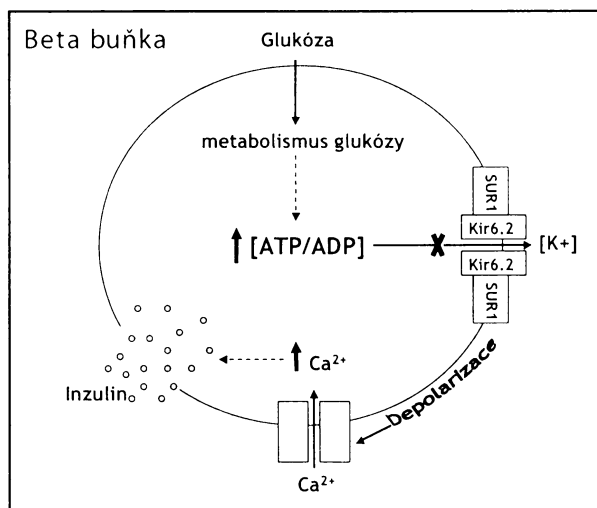
ATP-senzitivní draselné kanály jsou přítomné v membránách mnoha typů buněk různých tkání, například v buňkách kosterního a srdečního svalu, v hladkých svalech cév, neuronech či v beta buňkách pankreatu. Řadí se k široké skupině membránových iontových kanálů, které koordinují buněčné funkce, jako je neurotransmise, kontrakce, sekrece či regulace buněčného objemu. Přítomnost iontových kanálů není omezena na elektricky vzrušivé buňky. Jsou umístěny v plazmatických membránách všech živočišných buněk, v buňkách mikroorganismů i v buňkách rostlinných. Kanály jsou iontově specifické, k nejběžnějším patří sodíkové, draselné, vápníkové a chloridové. Pro všechny iontové kanály je charakteristická neustálá fluktuace mezi otevřeným a zavřeným stavem. Který stav bude v dané chvíli pro buňku pravděpodobnější, určuje intracelulární či extracelulární koncentrace látek, které otevírání stimulují či inhibují, nebo mohou kanály reagovat na změny membránového potenciálu. ATP-senzitivní draselné kanály beta buněk pankreatu umožňují převod vnitrobuněčných metabolických změn ve změny elektrické aktivity plazmatických membrán buněk a jsou klíčové pro regulaci inzulínové sekrece. Jejich počet je v případě pankreatu odhadován asi na 600-1200 na buňku (Ohno-Shosaku et al. 1987, Schmid-Antomarchi et al. 1987). Uzavření kanálů je důležitým předpokladem pro spuštění sekrece inzulínu, zatímco jejich otevření vede k inhibici sekrece tohoto hormonu (Gribble 2003).

STRUKTURA A FUNKCE DRASELNÉHO KANÁLU BETA BUNĚK

Draselné kanály v beta buňkách pankreatu jsou oktamerární komplexy tvořené rozsáhlou regulační částí a vlastním pórem kanálu. Regulační část je tetramer složený ze sulfonyleureových receptorů typu 1 (SUR1, OMIM 600509), pár kanálu je opět tetramer sestávající z podjednotek nazývaných Kir6.2 (potassium inward rectifier 6.2, OMIM 600937) nebo také BIR (Beta-cell inward rectifier) (Clement et al. 1997).

Jak SUR1 podjednotky, tak Kir6.2 podjednotky jsou nezbytné pro správnou regulaci metabolické funkce kanálu: stěžejní je koncentrace ATP uvnitř buňky (poměr ATP/ADP). Je-li koncentrace ATP nízká, draselné kanály jsou převážně otevřené a umožňují tok draslíku po směru elektrochemického gradientu ven z buňky, membránový potenciál je tak udržován v hyperpolarizovaném stavu. Příjem glukózy a následný vzestup intracelulární koncentrace ATP vede k uzavření kanálu vazbou ATP na Kir6.2 podjednotky, což spouští kaskádu reakcí umožňujících zahájení inzulínové sekrece: draslík nemůže uzavřenými

kanály unikat z buňky, dochází k depolarizaci buněčné membrány, tím jsou otevírány napětově závislé vápníkové kanály a následný vzestup intracelulárního vápníku proudícího po koncentračním spádu do buněk vede k exocytóze inzulínových granulí z beta buněk pankreatu (obr. 1). Sulfonyleurea a její deriváty (např. tolbutamid, glibenclamid, jodglibenclamid, azidoglibenclamid) stimuluje inzulínovou sekreci vazbou na svůj receptor, tedy na SUR1 podjednotku, což vede k uzavření draselného kanálu a sekreci inzulínu nezávisle na koncentraci ATP v beta buňce (Gribble 2003). Tohoto efektu sulfonyleurey a jejích derivátů se využívá při léčbě DM2. Pátrání po přirozeném analogu sulfonyleurey, který by měl v organismu regulační funkci pro činnost draselných kanálů beta buněk, vedlo k izolaci peptidů, tzv. endosulfínů (Virsolvy-Vergine 1996). Tyto molekuly vykazují vysokou afinitu k sulfonyleureovým receptorům a u beta buněk dokáží stimulovat sekreci inzulínu. Naopak ADP ve vazbě na hořčnaté ionty (Mg-ADP) také interaguje se SUR1 podjednotkami draselného kanálu, působí však jejich otevření a je tak výrazným inhibitorem inzulínové sekrece (Dunne 1986, Misler et al. 1986, Weiss 1993). Jsou známy i mnohé další látky, které podporují otevření draselných kanálů následované hyperpolarizací plazmatické membrány a inhibicí inzulínové sekrece. Klinicky se využívají při léčbě hyperinzulinemických stavů a jelikož působí relaxačně na hladké svaly cév, uplatňují se též při léčbě hypertenzních stavů. Patří k nim např. diazoxid a jeho derivát NN414 (Ritzel 2004), dále pinacidil nebo cromakalim. Předpokládá se, že vazebné místo těchto molekul se nalézá také na SUR1 podjednotce, jeho přesné umístění a struktura však dosud známa není.



obr. 1

CHROMOSOMÁLNÍ LOKALIZACE

Gen kódující SUR1 je nazýván ABCC8 (náleží do tzv. ATP-binding cassette rodiny, v jejím rámci do podrodiny C, člen 8), gen kódující Kir6.2 byl pojmenován KCNJ11 (patří do rodiny zvané Potassium channel inwardly rectifying, podrodiny J, člen 11). Oba leží na krátkém raménku chromozomu 11 (proužek 11p15.1), přičemž stop kodon SUR1 a start kodon Kir6.2 jsou odděleny

pouze 4900 bp (Inagaki et al. 95, Thomas et al. 1995a, Ashfield 1998). Gen kódující SUR1 obsahuje 39 exonů o velikosti pohybující se od 33 do 243 bp, celkový protein SUR1 je složen z 1582 aminokyselin. Gen pro Kir6.2 neobsahuje žádné introny a kóduje úsek skládající se z 390 aminokyselin (Inagaki et al. 95).

POLYMORFISMY A MUTACE SPOJENÉ SE ZMĚNĚNOU FUNKCÍ DRASELNÝCH KANÁLŮ

Jak již bylo uvedeno, pro správnou regulaci funkce draselného kanálu a tedy i pro vyváženou regulaci sekrece inzulínu je nezbytná bezchybná funkce jak SUR1 tak Kir6.2 podjednotek. Smutným dokladem tohoto tvrzení je vrozená porucha glykoregulace nazvaná perzistentní hyperinzulinemická hypoglykemie dětí, PHHI (persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy). Jde o vzácnou metabolickou poruchu projevující se již u novorozenců těžkými stavy hypoglykemie s neschopností suprese inzulínové sekrece. K udržení přijatelných hodnot glykemie je třeba podávat těmto dětem infuze glukózy a zahájit vhodnou terapii, která se volí v závislosti na genetické příčině onemocnění. Postiženou molekulou může být například právě regulační SUR1 podjednotka kanálu, ale také pór formující podjednotka Kir6.2. Onemocnění mohou navíc způsobit mutace i jiných molekul zapojených do glykoregulačních mechanismů, např. glukokinázy (Glaser et al. 1998), glutamindehydrogenázy (Stanley et al. 1997) a dalších. Ne vždy se podaří odpovědnou mutaci detekovat a najít účinnou terapii, ve vážných případech je třeba pro udržení přijatelného rozmezí hodnot glykemie a ochraně dítěte před mentální retardací přistoupit k částečné či subtotální pankreatomii. S projevy PHHI byly poprvé spojeny mutace v genu pro SUR1 (Glaser et al. 1994, Thomas et al. 1995a, Thomas et al. 1995b) a v současné době je známo přes 20 různých substitucí, inzercí a delecí v intronech i exonech tohoto genu s různým stupněm závažnosti onemocnění, od mírných farmakologicky zvládnutelných projevů, až po úplnou absenci aktivity draselných kanálů v beta buňkách. V podjednotce Kir6.2 bylo popsáno též několik mutací vedoucích k projevům PHHI (Thomas et al. 1996, Nestorowicz et al. 1997). Na druhé straně jsou známy mutace a polymorfismy, které vedou k vyšší aktivitě draselných kanálů v beta buňkách a tím ve svém důsledku snižují schopnost inzulínové sekrece a mohou být jedním z významných faktorů predisponujících či přímo vedoucích (Gloyn et al. 2004) k rozvoji DM2. Takové polymorfismy budí v posledních letech veliký zájem vědců i lékařů.

POLYMORFISMUS E23K

K nejčastěji diskutovaným genetickým variantám tohoto typu patří záměna obvyklé kyseliny glutamové ve 23. kodónu genu kódujícím Kir6.2 podjednotku draselného kanálu za lysin, substituce je nejčastěji značena podle jednopísmenných zkratk aminokyselin jako polymorfismus E23K. Z elektrofyziologických studií provedených

na tkáňových kulturách s vnesenými lidskými izoformami genu vyplývá, že substituce zvyšuje práh koncentrace ATP, který je nutný pro uzavření draselných kanálů a tím mírně snižuje inzulínovou sekreci (Schwanstecher et al. 2002a). U heterozygotní konstelace EK byla citlivost vůči ATP snížena 1,4krát, u homozygotní KK dokonce 2,2krát. Vzhledem k tomu, že minoritní alela K kódující lysin je dosti hojně zastoupena (v závislosti na etnické příslušnosti studované populace přibližně od 30 do 40 %), může i její relativně malý vliv na schopnost inzulínové sekrece představovat pro populaci velkou predispoziční zátěž. Ve všech dosud testovaných etnických skupinách má navíc minoritní alela velmi podobnou četnost. Vystává otázka, proč je v procesu evoluce alela, která se zdá být z hlediska diabetu riziková a pro svého nositele nevýhodná, udržována v tak vysokém zastoupení, zda přináší i nějakou selekční výhodu. Jedno možné vysvětlení je takové, že její nositelé mají vzhledem k mírně snížené schopnosti inzulínové sekrece také odpovídající měrou sníženou spotřebu v krvi kolující glukózy tkáněmi na inzulínu závislými (svalová a tuková tkáň) ve prospěch tkání na inzulínu nezávislých (tkáň mozková). Jednalo by se o evoluční adaptaci na odlišné nároky tkání na dodávku energie (Schwanstecher 2002b).

Genetické asociačních studie, které sledují vztah mezi určitým polymorfismem a fenotypickými charakteristikami určité skupiny jedinců, vyžadují pro hodnotné statistické zpracování s dostatečnou silou testů početně velmi rozsáhlé soubory. Studie, která zkoumala vztah polymorfismu E23K k DM2 a zahrnovala 2036 jedinců (Gloyn et al. 2003b), dospěla k závěrům, které korespondují s pozorováními učiněnými elektrofyziologickými metodami na buněčných kulturách. Byla porovnáвана četnost minoritní alely a genotypická distribuce mezi skupinou diabetiků 2. typu a kontrolními zdravými jedinci. U diabetiků byla hojněji zastoupena riziková alela K (40 % oproti 36 % v kontrolní skupině) a také genotypické srovnání odhalilo vyšší procento rizikové kombinace alel KK mezi diabetiky (16 % oproti 13 % v kontrolní skupině). U kontrolních jedinců byla naopak ve srovnání s diabetiky častější protektivní kombinace EE (42 % vs. 36 %). Studie uzavírá, že polymorfismus E23K je asociován s lehce zvýšeným rizikem DM2. Závěry asociačních studií nebývají vždy jednoznačné. Liší se např. v závislosti na etnické příslušnosti testované populace, ale i v rámci jednoho etnika mohou být mezi studii značné diskrepance. Proto se někdy přistupuje k tzv. metaanalýzám (Hani et al. 1998, Gloyn et al. 2003b, Nielsen et al. 2003, Love-Gregory et al. 2003). Jde o projekty, které sledují a shromažďují pozorování výzkumných týmů soustředěných na jedno společné téma u vymezené populace (např. u jedinců kavkazského původu) a ve svém konečném zpracování z těchto příspěvků vycházejí. Tento přístup vedl k závěrům, že odhad zátěže, jímž polymorfismus E23K přispívá (tzv. population attributable proportion), činí v populaci kavkazského původu 15 % (Schwanstecher 2002b). Znamenalo by to, že kdyby v evoluci nedošlo v genu pro Kir6.2 ve 23. kodónu k substituci glutamové kyseliny za lysin a všichni lidé by tedy byli nositeli genotypu EE, bylo by v kavkazské populaci o 15 % diabetiků 2. typu méně. Tak vysoké procento by činilo z tohoto polymorfismu

jeden z nejdůležitějších genetických rizikových markerů, které kdy byly ve vztahu k DM2 odhaleny.

Úskalím metaanalýz je, že pozitivní pozorování, která svědčí o asociaci zkoumaného genetického polymorfismu s daným onemocněním, mají vyšší publikační atraktivitu a jejich zastoupení v konečném hodnocení metaanalýz proto může být ve srovnání s pozorováními, která asociace nepotvrzují, uměle vyšší (tzv. publikační bias). Přesto patří v současné době polymorfismus E23K silou své asociace s DM2 k nejvýznamnějším a pro nositele rizikové alely K a zvláště pro homozygoty genotypu KK představuje určitou genetickou zátěž. Význam této genetické varianty spočívá ale zejména v tom, že odhalení její důležitosti a důkladné poznání její funkce ve složitě etiopatogenezi DM2 skýtá právě pro diabetiky, u nichž má na rozvoji onemocnění podíl konkrétní genotyp, naději na velmi přesně zacílenou léčbu. Farmaka by mohla působit přímo na funkci pozměněného genu a výrazně tak snížit závažnost onemocnění s minimálními vedlejšími účinky pro léčeného člověka.

Podporováno granty:

IGA MZ ČR NR/7809-5, GAČR 301/04/1085, COST OC B17.10 MŠMT

LITERATURA:

- Ashfield R, Ashcroft SJ. Cloning of the promoters for the beta-cell ATP-sensitive K-channel subunits Kir6.2 and SUR1. *Diabetes* 1998; 47: 1274-80.
- Clement JP 4th, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* 1997; 18: 827-38.
- DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 1992; 15: 318-368.
- Dunne MJ, Petersen OH. Intracellular ADP activates K⁺ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett* 1986; 208: 59-62.
- Glaser B, Chiu KC, Anker R, Nestorowicz A, Landau H, Ben-Bassat H, Shlomai Z, Kaiser N, Thornton PS, Stanley CA. Familial hyperinsulinism maps to chromosome 11p14-15.1, 30cM centromeric to the insulin gene. *Nat Genet* 1994; 7: 185-8.
- Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matschinsky FM, Herold KC. Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med* 1998; 338: 226-30.
- Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JM, Molnes J, Edghill EL, Frayling TM, Temple IK, Mackay D, Shield JP, Sumnik Z, van Rhijn A, Wales JK, Clark P, Gorman S, Aisenberg J, Ellard S, Njolstad PR, Ashcroft FM, Hattersley AT. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med* 2004; 350: 1838-49.
- aGloyn AL. The search for type 2 diabetes genes. *Ageing Res. Review* 2003; 2: 111-127.
- bGloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Halford S, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 568-72.
- Gribble FM, Reimann F. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia* 2003; 46: 875-91.
- Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Tuomi T, Karanko S, Nissen M, Ehrnstrom BO, Forsen B, Isomaa B, Snickars B, Taskinen MR. Metabolic consequences of a family history of NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects. *Diabetes* 1996; 45: 1585-1593.
- Groop LC, Tuomi T. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - A collision between thrifty genes and an affluent society. *Ann. Med* 1997; 29: 37-53.
- Hani EH, Boutin P, Durand E, Inoue H, Permutt MA, Velho G, Froguel P. Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K⁺ channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia* 1998; 41: 1511-5.
- Inagaki N, Gono T, Clement JP 4th, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 1995; 270: 1166-70.
- LeRoith D. Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *Am. J. Med* 2002; 113 (Suppl 6A): 3S-11S.
- Love-Gregory L, Wasson J, Lin J, Skolnick G, Suarez B, Permutt MA. E23K single nucleotide polymorphism in the islet ATP-sensitive potassium channel gene (Kir6.2) contributes as much to the risk of Type II diabetes in Caucasians as the PPARgamma Pro12Ala variant. *Diabetologia* 2003; 46: 136-7.
- McCarthy MI, Froguel P, Hitman GA. The genetics of non-insulin dependent diabetes mellitus: tools and aims. *Diabetologia* 1994; 37: 959-968.
- Misler S, Falke LC, Gillis K, McDaniel ML et al. A metabolite-regulated potassium channel in rat pancreatic B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 7119-23.
- Nestorowicz A, Inagaki N, Gono T, Schoor KP, Wilson BA, Glaser B, Landau H, Stanley CA, Thornton PS, Seino S, Permutt MA. A nonsense mutation in the inward rectifier potassium channel gene, Kir6.2, is associated with familial hyperinsulinism. *Diabetes* 1997; 46: 1743-8.
- Nielsen EM, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T, Glumer C, Thorsteinsson B, Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O. The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 573-7.
- Ohno-Shosaku T, Zunkler BJ, Trube G. Dual effects of ATP on K⁺ currents of mouse pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch* 1987; 408: 133-8.
- Ritzel RA, Hansen JB, Veldhuis JD, Butler PC. Induction of beta-cell rest by a Kir6.2/SUR1-selective K(ATP)-channel opener preserves beta-cell insulin stores and insulin secretion in human islets cultured at high (11 mM) glucose. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(2): 795-805.
- Schmid-Antomarchi H, De Weille J, Fosset M, Lazdunski M. The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K⁺ channel in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 15840-4. Erratum in: *J Biol Chem* 1989; 264: 10926.

- aSchwanstecher C, Meyer U, Schwanstecher M. K(IR)6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic beta-cell ATP-sensitive K(+) channels. *Diabetes* 2002; 51: 875-9.
- bSchwanstecher C, Schwanstecher M. Nucleotide sensitivity of pancreatic ATP-sensitive potassium channels and type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51 Suppl 3: S358-62.
- Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, Poncz M. Hypoglycemia in infants with hyperinsulinemia and hyperammonemia: gain of function mutations in the pathway of leucine-mediated insulin secretion. *Diabetes* 1997; 46: 217A
- Thomas P, Ye Y, Lightner E. Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1809-12.
- aThomas PM, Cote GJ, Hallman DM, Mathew PM. Homozygosity mapping, to chromosome 11p, of the gene for familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 416-21.
- bThomas PM, Cote GJ, Wohlk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J. Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 1995; 268: 426-9.
- Turner R, O'Rahilly S, Levy J, Rudenski A, Clark A. Does type II diabetes arise from a major gene defect producing insulin resistance or beta-cell dysfunction? In: Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Hokfelt B. *Genes and genes products in the development of diabetes mellitus*. Elsevier, Amsterdam 1989; pp 171-183.
- Virsolvy-Vergine A, Salazar G, Sillard R, Denoroy L, Bataille D. Endosulfine, endogenous ligand for the sulphonylurea receptor: isolation from porcine brain and partial structural determination of the alpha form. *Diabetologia* 1996; 39(2): 135-41.
- Weiss JN, Venkatesh N. Metabolic regulation of cardiac ATP-sensitive K+ channels. *Cardiovasc Drugs Ther* 1993; 7 (Suppl 3): 499-505.

Mgr. Daniela Šrámková
Endokrinologický ústav, odd. OME
Národní 8, 116 94 Praha 1
tel.: 224 905 301
e-mail: dsramkova@endo.cz

7. PREZENTACE VÝSLEDKŮ NA VĚDECKÝCH SYMPOSIÍCH

Dílčí výsledky studií shrnutých v dizertační práci byly prezentovány formou přednášek či posterových sdělení na následujících českých i mezinárodních symposiích:

- **Šrámková D.**, Bláha P., Lisá L., Šrajcer J., Malbohan I. Korelace leptinu s antropometrickými parametry během redukční léčby obézních dětí. 6. státní konference „Obezitologie 99“, Plzeň 1999 – přednáška.
- **Šrámková D.** Gen PPAR γ : novinky v obezitologii a diabetologii. Symposium Prof. Jiřího Malého 2000, Národní muzeum, Praha 2000 - přednáška.
- **Šrámková D.**, Kunešová M., Hainer V., Včelák J., Bendlová B. Studium polymorfismu Pro12Ala genu PPAR γ 2 ve vztahu k obezitě a diabetes mellitus 2. typu. 37. diabetologické dny v Luhačovicích 19.-21. dubna 2001: DMEV 2001;4 (suppl. 1): 49 (76) - přednáška.
- **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? 4th International Smolenice Insulin Symposium on Lipids and Insulin Resistance, August 29-September 2, 2001, Smolenice Castle, Slovak Republic. Sborník abstrakt:101 - přednáška.
- **Šrámková D.**, Kunešová M., Hainer V., Hill M., Včelák J., Bendlová B. The Pro12Ala PPAR γ 2 Gene Polymorphism in Czech Type 2 Diabetics and Obese Patients. European Association for the Study of Diabetes, 37th Annual Meeting, 9-13 September 2001, Glasgow, United Kingdom. Diabetologia 2001;44(suppl.1): 346, A91 - diskutovaný poster.
- **Šrámková D.**, Kunešová M., Hainer V., Hill M., Včelák J., Bendlová B. Polymorfismus Pro12Ala genu PPAR γ 2 u českých diabetiků 2. typu a u obézních jedinců. 8. státní konference „Obesitologie 2001“ Dolní Lipová 8. –10. 11. 2001 - přednáška.
- **Šrámková D.**, Kunešová M., Hainer V., Hill M., Včelák J., Bendlová B. Je polymorfismus Pro12Ala genu PPAR γ 2 asociován s obezitou a diabetem 2. typu u české populace? Symposium Prof. Vojtěcha Fettera, Národní muzeum v Praze, 29.-30. 11. 2001 - přednáška.

- Kunešová M., Hainer V., Mikulová R., Wagenknecht M., Pařízková J., **Šrámková D.**, Bendlová B. Adipose tissue distribution in women: examination by computer tomography: relations to hormonal and metabolic parameters. Evropská obezitologická konference, Vídeň 2001, Int J Obesity 2001;25(suppl. 2): S 95 – poster.
- Kunešová M., Hainer V., Obenberger J., Mikulová R., Wagenknecht M., Pařízková J., **Šrámková D.**, Bendlová B. Relations of hormonal and metabolic parameters to intraabdominal and subcutaneous abdominal adipose tissue in obese women. Influence of Pro12Ala PPAR gamma polymorphism on adipose tissue distribution. Obesity Research 2001;9(suppl. 3): 67S – poster.
- **Šrámková D.**, Bendlová B. Rezistin. Seminář Endokrinologického ústavu konaný 28.6.2002.
- **Šrámková D.**, Kunešová M., Hainer V., Hill M., Včelák J., Bendlová B. The Pro12Ala PPARgamma2 Gene Polymorphism in Czech Type 2 Diabetics and Obese Patients. COST Action B17 Working Group 1: Genetic Aspects of Type 2 Diabetes Mellitus in Relation to Ageing-induced Changes in Insulin Action and Secretion. Prague, 16. 2. 2002 - přednáška.
- **Šrámková D.**, Krejbichová Š., Včelák J., Bendlová B. Polymorfismus A-G (-3826) genu UCP1 u souboru českých diabetiků 2. typu. XXXVIII. Diabetologické dny, Luhačovice, 18.-20. dubna 2002. DMEV 2002;5(suppl. 1): A77, 50 - přednáška.
- **Sramkova D.**, Krejbichova S., Vcelak J., Bendlova B. The A-3826G polymorphism of the UCP1 gene promoter in Czech Type 2 diabetic patients. 38 th EASD Annual meeting, Budapest 1-5 September 2002. Diabetologia 2002;45(suppl. 2): A123: 371 - diskutovaný poster.
- **Šrámková D.**, Vaňková M., Včelák J., Bendlová B. Pro12Ala polymorphism of the PPARg2 gene is associated with lower insulinemia and HOMA-R in Czech DM2 patients. European Science Foundation-Functional Genomics (ESFFG), 1st Conference, May 14-17, 2003, Prague Hilton Hotel, Czech Republic. Abstract;140:PD5/259 - poster.
- **Šrámková D.**, Vaňková M., Včelák J., Bendlová B. Polymorphism Pro12Ala of the PPARg2 gene is associated with lower insulinemia and HOMA-R in Czech Type 2 diabetes mellitus patients. 18th International Diabetes Federation Congress (IDF), August 24-29, 2003, Paris, France: Diabetologia 2003;46(suppl. 2):A128:359 - diskutovaný poster.

- Vankova M., **Sramkova D.**, Samalikova P., Vcelak J., Kvasnickova H., Vondra K., Bendlova B. Beta cell function and insulin resistance in relation to candidate genes of diabetes mellitus Type 2 in Czech population. The European Association for the Study of Diabetes, the 40th Annual Meeting, Munich 5-9 September 2004. Diabetologia 2004; 47 (suppl. 1): A209: 572 - diskutovaný poster.
- Vaňková M., **Šrámková D.**, Šamalíková P., Včelák J., Kvasničková H., Vondra K., Bláha P., Bendlová B. Inzulínová rezistence a funkce beta-buněk ve vztahu ke kandidátním genům DM2. XXVII. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí v Piešťanech 30.9.-2.10.2004. Interná Medicína 2004;4(9), suppl. S3: 19S - přednáška.
- **Šrámková D.**, Vaňková M., Šamalíková P., Včelák J., Vondra K., Bendlová B. Polymorfismy E23K genu KCNJ11 a G-866A genu UCP2 ve vztahu k DM2 u české populace. XXVII. Endokrinologické dny, Piešťany, 29.9.-2.10. 2004., Interná Medicína 2004;4 (9), suppl. S3: 41S – poster.
- Bendlová B., **Šrámková D.**, Vaňková M., Šamalíková P., Včelák J., Stanická S., Dvořáková K., Vondra K., Cibula D., Vrbíková J. Rizikové polymorfismy genů UCP1 a PPARgamma2 u pacientek se syndromem polycystických ovárií. XXVII. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí v Piešťanech 30.9.-2.10.2004. Interná Medicína 2004;4 (9), suppl. S3: 33S - přednáška.
- Vrbíková J., Vaňková M., **Šrámková D.**, Dvořáková K., Stanická S., Hill M., Hainer V., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová, B. Inzulínová senzitivita, hladiny androgenů a adipokinu u žen se syndromem polycystických ovárií. XXVII. Endokrinologické dny, Piešťany, 29.9.-2.10. 2004. Interná Medicína 2004;4(9), suppl. S3:41S - diskutovaný poster.
- Včelák J., **Šrámková D.**, Vaňková M., Šamalíková P., Kvasničková H., Vondra K., Bláha P., Bendlová B. Je somatotyp spojen s některým ze sedmi kandidátních genů obezity a DM2? XXVII. Endokrinologické dny , Piešťany, 29.9.-2.10. 2004. Interná Medicína 2004;4(9), suppl. S3: 19S - přednáška.
- Aldhoon B., Hainer V., Bendlová B., Kunešová M., Pařízková J., Kabrnová K., Braunerová R., Wagenknecht M., **Šrámková D.**, Hlavatý P. PPARgamma polymorphism in obesity: weight-loss maintenance, psychobehavioral indexes and energy intake during 4-year follow-up.

13th European Congress on Obesity, Prague, Czech Rep., 26.-29.2004. Int J Obesity 2004;28 (suppl. 1):T3: P3-001 - poster.

- **Šrámková D.**, Vaňková D., Šamalíková P., Včelák J., Hainer V., Bendlová B. The Kir6.2 gene E23K SNP in relation to DM2 in Czech population. 13th European Congress on Obesity, Prague, Czech Rep., 26.-29.2004. Int J Obesity 2004;28(suppl. 1):T3: P3-025 - poster.
- Bendlová B., Včelák J., Vaňková M., **Šrámková D.**, Šamalíková P., Kvasničková H., Vondra K. Study of the genetic background of the glucose curve types in Czech population. 40th EASD Munchen, 6-9 September 2004. Diabetologia 2004;47(suppl. 1):A189:517 - diskutovaný poster.
- Vaňková M., **Šrámková D.**, Šamalíková P., Včelák J., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B. Beta-cell function and insulin resistance in relation to candidate genes of diabetes mellitus type 2 in Czech population. 40th EASD Munchen, 6-9 September 2004. Diabetologia 2004;47(suppl. 1):A209: 572 - diskutovaný poster.
- Bendlová B., **Šrámková D.**, Vaňková M., Šamalíková P., Včelák J., Stanická S., Dvořáková K., Vondra K., Cibula D., Vrbíková J. The risk polymorphisms of UCP1 and PPARG2 genes in patients with polycystic ovary syndrome. Carotenoids and Dietary Lipids in Health and Disease and COST B17 WG1 Action. Krakow 9.-12.12.2004. Acta Angiologica 2004;10:35 - vyzvaná přednáška.
- Vaňková M., **Šrámková D.**, Šamalíková P., Včelák J., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B. Insulin resistance and the beta cell function in relation to selected DM2 candidate genes. Carotenoids and Dietary Lipids in Health and Disease and COST B17 WG1 Action. Krakow 9.-12.12.2004. Acta Angiologica 2004;10:35-36 – krátká prezentace.
- **Šrámková D.**, Vaňková M., Šamalíková P., Včelák J., Hainer V., Bendlová B.: The KCNJ1 I gene polymorphism E23K in relation to DM2 in Czech population. Carotenoids and Dietary Lipids in Health and Disease and COST B17 WG1 Action. Krakow 9.-12.12.2004. Acta Angiologica 2004;10:36 – krátká prezentace.
- **Šrámková D.**, Vaňková M., Šamalíková P., Včelák J., Hainer V., Bendlová B. Polymorfismus E23K genu KIR6.2 ve vztahu k diabetu mellitus 2. typu v České republice.

XL. Diabetologické dny v Luhačovicích, 22.4.-24.4.2004. DMEV 2004;7(suppl. 1):44:A55-diskutovaný poster.

• Vaňková M., **Šrámková D.**, Lukášová D., Včelák J., Stanická S., Dvořáková K., Vondra K., Cibula D., Vrbíková J., Bendlová B. UCP1 (A-3826G) and PPARgamma2(Pro12Ala) polymorphisms in women with polycystic ovary syndrome. 24th Joint Meeting of the British Endocrine Society, April 4-6, 2005, Herrogate, UK. Endocrine Abstracts 2005;9:P77-diskutovaný poster.

• Bendlová B., **Šrámková D.**, Burkoňová D., Vaňková M., Lukášová P., Včelák J., Vondra K. Free fatty acids concentration and composition is associated with family history of diabetes mellitus type 2 in Czech subjects. 41st Annual Meeting EASD, Athéns, 10.-14.9. 2005, Diabetologia 2005;48(suppl 1): A228:620 - diskutovaný poster

• Vaňková M., **Šrámková D.**, Lukášová P., Včelák J., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B. Metabolický syndrom u lidí s rodinnou anamnézou DM2. XLI. Diabetologické dny v Luhačovicích, 20.4.-23.4.2005. DMEV 2005;8(suppl. 1):50:A86 - diskutovaný poster.

• **Šrámková D.**, Burkoňová D., Vaňková M., Lukášová P., Včelák J., Vondra K., Bendlová B. Interakce složení volných mastných kyselin s polymorfismem v PPARgamma2 genu. XLI. Diabetologické dny v Luhačovicích, 20.4.-23.4.2005. DMEV 2005;8(suppl. 1):47:A80 - diskutovaný poster.

• Včelák J., **Vejražková D.**, Vaňková M., Lukášová P., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B. Srovnání inzulínového tolerančního testu s indexy inzulínové rezistence odvozenými z oGTT. XXVIII. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí. 20.-22.10.2005, Olomouc. Program a abstrakta:42 - přednáška.

• **Vejražková D.**, Vaňková M., Lukášová P., Včelák J., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B. Polymorfismus E23K genu KCNJ11 a G-866A genu UCP2 u české diabetické a nedianbetické populace. XXVIII. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí. 20.-22.10.2005, Olomouc. Program a abstrakta:183 - diskutovaný poster.

• **Vejražková D.**, Vaňková M., Lukášová P., Včelák J., Kvasničková H., Vondra K., Bendlová B. The KCNJ11 E23K and UCP2 G-866A SNPs in relation to DM2 in Czech population. 8th European Congress of Endocrinology incorporating the British Endocrine

Societies. 1-5 April 2006, Glasgow, UK. Endocrine Abstracts 2006;11:P386 - diskutovaný poster.

- Bendlová B., Včelák J., **Vejražková D.**, Vaňková M., Dvořáková K., Vrbíková J., Hill M., Stárka L., Vondra K. Dehydroepiandrosterone in relation to obesity, insulin resistance and lipid spectra in Czech non-diabetic population. 8th European Congress of Endocrinology incorporating the British Endocrine Societies. 1-5 April 2006, Glasgow, UK. Endocrine Abstracts 2006;11: P376 - diskutovaný poster.

- Bendlová B., Včelák J., Vaňková M., Lukášová P., **Vejražková D.**, Zemanová A., Andělová K., Kvasničková H., Vondra K. Association of neurogenin 3 polymorphisms with insulin secretion. 42 nd Annual Meeting EASD, Copenhagen, Malmo, 14.-17.9. 2006. Diabetologia 2006;49(suppl 1): A0632:384 - diskutovaný poster.

- **Vejražková D.**, Včelák J., Vaňková M., Lukášová P., Kvasničková H., Bláha P., Vondra K., Bendlová B.: Candidate gene polymorphism for obesity and DM2: association with the somatotypes. 42 nd Annual Meeting EASD, Copenhagen, Malmo, 14.-17.9. 2006, Diabetologia 2006;49(suppl 1): A0761:461- diskutovaný poster.

- Bendlová B., Včelák J., Vaňková M., Lukášová P., **Vejražková D.**, Kvasničková H., Dvořáková K., Vondra K. Inzulínová rezistence-porovnání indexů odvozených z oGTT a inzulínového tolerančního testu a její genetické pozadí. XLII. Diabetologické dny, Luhačovice, 20.-22.4.2006. DMEV 2006;9(suppl. 2):16:A7 - diskutovaný poster.

- Lukášová P., **Vejražková D.**, Vaňková M., Včelák J., Vrbíková J., Andělová K., Kvasničková H., Dvořáková K., Vondra K., Bendlová B. Polymorfismus E23K v genu KCNJ11 u české populace gestačních diabetiček, žen se syndromem polycystických ovarií a kontrolní skupiny zdravých žen. XLII. Diabetologické dny, Luhačovice, 20.-22.4.2006. DMEV 2006;9(suppl. 2):36:A50 - diskutovaný poster.

8. LITERATURA

Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl M-C, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES. The common PPAR- γ pro12ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nature Genet* 2000;26:76-80.

Andersson U, Filipsson K, Abbot CR et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 2004 Mar 26;279(13):12005-8.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79-83.

Auwerx J. PPAR γ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 1999;42:1033-1049.

Bastian W. Genes with linkage or association with type 2 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15 Suppl.1:471-484.

Barroso I. Genetics of type 2 diabetes. *Diabetes Med* 2005;5:517-535.

Bendlová, B. Genetika syndromu polycystických ovárií. In Cibula, D., Stárka, L., Vrbíková, J. (Eds.) *Syndrom polycystických ovárií*. Praha, Maxdorf Jessenius, 2004, s. 34-42.

Bergman RN. Non-esterified fatty acids and the liver: why is insulin secreted into the portal vein? *Diabetologia* 2000; Jul 43(7):946-952.

Bernal-Misrachi E, Cras-Meneur C et al. Gene expression profiling in islet biology and diabetes research. *Diabetes Metab Res Rev* 2003;19(1):32-42.

Bláha P. ANTROPO - ein Programm für automatische Bearbeitung anthropologischer Daten. *Wiss. Zeitschrift der Humboldt-Universität zu Berlin* 1991;5:153-156.

Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 2004;73:417-435.

Buzzetti R, Petrone A, Ribaud MC, Alemanno I, Zavarella S, Mein CA, Maiani F, Tiberti C, Baroni MG, Vecci E, Arca M, Leonetti F, Di Mario U. The common PPAR- γ -2 pro12-to-ala variant is associated with greater insulin sensitivity. *Europ J Hum Genet* 2004;12:1050-1054.

Cardon LR, Bell JI. Association study design for complex diseases. *Nature Reviews – Genetics* 2001;2:91-99.

Cibula D, Stárka L, Vrbíková J. *Syndrom polycystických ovárií*. Maxdorf. Jessenius. Praha 2004, 121 s. ISBN 80-7345-005-4.

Cinti S, Zancanaro C, Sbarbati A et al. Immunoelectron microscopical identification of the uncoupling protein in brown adipose tissue mitochondria. *Biol Cell* 1989;67:359-362.

Clerget-Darpoux F, Bonaiti- Pellié C. Strategies based on marker information for the study of human diseases. *Ann Hum Genet* 1992;56:145-153.

Colagiuri S, Brand Miller JCB. The metabolic syndrome: from inherited survival trait to a health care problem. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997;105,Suppl.2:54-60.

Damcott CM, Sack P, Shuldiner AR. The genetics of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003; 32:761-786.

Deeb SS, Fajas L, Nemoto M et al. A pro12ala substitution in PPAR-gamma-2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Genet* 1998;20:284-287.

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 1992;15:318-368.

Diamond J. The double puzzle of diabetes. *Nature* 2003;423:599-602.

Dunaif A: Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: Mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;18:774-800.

Duncan BB, Schmidt MI. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:1799-1805.

Elbain SC. Perspective: the search for genes for type 2 diabetes in the post-genome era. *Endocrinology* 2002;143(6):2010-2018.

Elbein SC. The genetics of human noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Nutr* 1997;127:1891S-1896S.

Esterbauer H, Oberkofler H, Liu YM et al. Uncoupling protein-1 mRNA expression in obese human subjects: the role of sequence variations at the uncoupling protein-1 gene locus. *J Lipid Res* 1998;39:834-844.

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R et al. Organization, promoter analysis and expression of the human PPAR γ Gene. *J Biol Chem* 1997;272:18779-18789.

Frederiksen L, Brodback K, Fenger M, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, Urhammer SA. Studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(8):3989-3992.

Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 2002;60:S1-14; discussion S68-84, 85-117.

Froguel P, Velho G. Molecular Genetics of Maturity-onset Diabetes of the Young. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10(4):142-146.

Garruti G, Ricquier D. Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992;16:383-390.

Gloyn AL. The search for type 2 diabetes genes. *Ageing Res Rev* 2003;2:111-127 Review.

Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR et al. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003 Feb;52(2):568-572.

Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2563-2568.

Greenberg AS, McDaniel ML. Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 2002;32, Suppl.3:24-34.

Groop LC, Forsblom C, Lehtovirta M et al. Metabolic consequences of a family history of NIDDM (The Botnia Study). *Diabetes* 1996;45:1585-1593.

Groop LC, Tuomi T. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - A collision between thrifty genes and an affluent society. *Ann Med* 1997;29:37-53.

Hainer V a kol. *Základy klinické obezitologie*. Praha, Grada Publishing 2004, 356 s.

Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) Diabetes mellitus: The thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.

Hamann A, Münzberg H, Buttron P et al. Missense variants in the human peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 gene in lean and obese subjects. *Eur J Endocrin* 1999;141:90-92.

Hani EH, Boutin P, Furane E et al. Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K⁺ channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role on the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia* 1998;41:1511-1515.

Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, von Schulthess GK. Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29(10):1393-1398. Epub 2002 Aug 8.

Hansen SK; Nielsen E-MD; Ek J, Andersen G; Glumer C; Carstensen B; Mouritzen P; Drivsholm T; Borch-Johnsen K; Jorgensen T; Hansen T; Pedersen O. Analysis of separate and combined effects of common variation in KCNJ11 and PPARG on risk of type 2 diabetes. *J Clin Endocr Metab* 2005;90:3629-3637.

Hasstedt SJ, Ren QF, Teng K, Elbein SC. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 pro(12)ala variant on obesity, glucose homeostasis, and blood pressure in members of familial type 2 diabetic kindreds. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(2):536-541.

Hattersley AT. Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabet Med* 1998;15(1): 15-24.

Hayashi K, Yandell D.W. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat.* 1993; 2: 338-346.

Heilbronn LK, Kind KL, Pancewicz E et al. Association of -3826G variant in uncoupling protein-1 with increased BMI in overweight Australian women. *Diabetologia* 2000;43:242-244.

Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL et al. 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* 2001;50:1126-1133.

Hussain MA. Polygenic models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Europ J Endocrinol* 1997;137:453-454.

Inagaki N, Gonoi T, Clement JP et al. Reconstitution of I(KATP): an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 1995;270:1166-1170.

Issemann I, Green S. Activation of a number of the steroid receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347:645-650.

Kahn AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathway. *Diabetologia* 2002;45:1475-1483.

Kim KS; Choi SM; Shin SU; Yang HS; Yoon Y. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-2 pro12ala polymorphism on body fat distribution in female Korean subjects. *Metabolism* 2004;53:1538-1543.

Klingenberg M. Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *Trends Biochem Sci* 1990;15:108-112.

Kolehmainen M; Uusitupa MIJ, Alhava E; Laakso M; Vidal H. Effect of the pro12ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma-2 gene on the expression of PPAR-gamma target genes in adipose tissue of massively obese subjects. *J Clin Endocr Metab* 2003;88:1717-1722.

Kopecký J., Flachs P. Tkáňový metabolismus a obezita, In: Hainer a kol., Praha, Grada Publishing, 2004, s. 121-152.

Koster JC, Marshall BA, Ensor N, Corbett JA, Nichols CG. Targeted overactivity of beta cell K(ATP) channels induces profound neonatal diabetes. *Cell* 2000;100:645-654.

Koyama K, Chen G, Lee Y, Unger RH. Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *Am J Physiol* 1997;273 (Endocrinol Metab 36):E708-E713.

LeRoith D. Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *Am J Med* 2002;113 Suppl. 6A:3S-11S.

Levine AS, Billington ChJ. Do circulating leptin concentrations reflect body adiposity or energy flux? *Am J Clin Nutr* 1998;68:761-762.

Lin X, Taguchi A, Park S et al. Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. *J Clin Invest* 2004;114:908-916.

Lohmueller KE; Pearce CL; Pike M; Lander ES; Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nature Genet* 2003;33:177-182.

Maassen JA. Mitochondrial diabetes: pathophysiology, clinical presentation, and genetic analysis. *Am J Med Genet* 2002;115(1):66-70.

Maeda N, Takahashi M, Funahashi T et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001;50:2094-2099.

McCarthy MI, Froguel P, Hitman GA. The genetics of non-insulin dependent diabetes mellitus: tools and aims. *Diabetologia* 1994;37:959-968.

McCarthy MI, Froguel P. Genetic approaches to the molecular understanding of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283(2):E217-225.

Memisoglu A; Hu FB; Hankinson SE; Manson JE, De Vivo I; Willett WC; Hunter DJ. Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass. *Hum. Molec. Genet* 2003;12:2923-2929.

Minotti AJ, Shah L, Keller K. Positron emission tomography/computed tomography fusion imaging in brown adipose tissue. *Clin Nucl Med* 2004;29(1):5-11.

Nagai N; Sakane N; Ueno LM; Hamada T; Moritani T. The -3826 A-G variant of the uncoupling protein-1 gene diminishes postprandial thermogenesis after a high fat meal in healthy boys. *J Clin Endocr Metab* 2003;88:5661-5667.

Neel JV. Diabetes mellitus: a „thrifty“ genotype rendered detrimental by „progress“? *Am J Hum Genet* 1962;14:353-362.

Nielsen ED, Hansen L, Carstensen B et al. The E23K Variant of Kir6.2 Associates With Impaired Post-OGTT Serum Insulin Response and Increased Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2003;52:573-577.

Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 2002;8:1376-1382.

Oh EY; Min KM; Chung JH; Min YK, Lee MS; Kim KW, Lee MK. Significance of pro12ala mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in Korean diabetic and obese subjects. *J Clin Endocr Metab*2000; 85:1801-1804.

Okamoto H, Nakae J, Kitamura T et al. Transgenic rescue of insulin receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2004;114:214-223.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y et al. Novel modular for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473-2476.

Owen K, Hattersley AT. Maturity-onset diabetes of the young: from clinical description to molecular genetic characterization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001;15(3):309-323.

Perseghin G, Ghosh S, Gerow K, Shulman GI. Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents. *Diabetes* 1997;46:1001-1009.

Rajala NW, Scherer PE. Minireview: the adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003;144:3765-3773.

Reaven G. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-1607.

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004;19:41-47.

Ristow M, Muller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med* 1998;339:953-959.

Seeley RJ, Woods SC. Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:901-909.

Schwanstecher C, Meyer U, Schwanstecher M. K(IR)6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic beta-cell ATP-sensitive K(+) channels. *Diabetes* 2002;51:875-879.

Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG et al. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 1992;13:387-414.

Schwartz MW, Porte D Jr. Diabetes, Obesity, and the Brain. *Science* 2005;307:375-379.

Spiegelman BM. PPAR γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998;47:507-514.

Svačina. Obezita, metabolický syndrom X a diabetes 2. typu.. In: Hainer a kol., Praha, Grada Publishing, 2004, s. 49-71.

Taylor S, Kadowaki T, Kadowaki H, Accili D, Cama A, McKeon C. Mutations in the insulin receptor gene in insulin-resistant patients. *Diabetes Care* 1991;13:257-259.

Thomas F, Balkau B, Vauzuelle-Kervroedan F, Papoz L and CODIAB-INSERM-Zeneca Study Group. Maternal effect and familial aggregation in NIDDM. The CODIAB study. *Diabetes* 1994;43:63-67.

Thomas PM, Cote GJ, Kallman D, Mathew PM. Homozygosity mapping, to chromosome 11p, of the gene for familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Am J Hum Genet* 1995;56:416-421.

Tschritter O, Fritsche A, Thamer C et al. Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. *Diabetes*. 2003;Feb 52(2):239-243.

Turner R, O'Rahilly S, Levy J, Rudenski A, Clark A. Does type II diabetes arise from a major gene defect producing insulin resistance or beta-cell dysfunction? In: Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Hokfelt B. (eds.) *Genes and genes products in the development of diabetes mellitus*. Elsevier 1989; Amsterdam, pp 171-183.

Unger RH. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:398-403.

Valve R, Heikkinen S, Rissanen A, Laakso M, Uusitupa M. Synergistic effect of polymorphisms in uncoupling protein-1 and beta(3)-adrenergic receptor genes on basal metabolic rate in obese Finns. *Diabetologia* 1998;41:357-361.

Valve R, Sivenius K, Miettinen R, Pihlajamaki J, Rissanen A, Deeb SS, Auwerx J, Uusitupa M, Laakso M. Two Polymorphisms in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Gene Are Associated with Severe Overweight among Obese Women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3708-3712.

Vamecq J, Lathrop N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *The Lancet* 1999;354:141-148.

van den Ouweland JKW, Lemkes HHPJ, Ruitenbeek W et al. Mutation in mitochondrial tRNA^{Leu} gene in a large pedigree with maternally-transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nature Genetics* 1992;1:368-371.

van Marken Lichtenbelt WD, Daanen HA. Cold-induced metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6(4):469-475.

Venkatesan AM et al. Insulin resistance in PCOS: progress and paradoxes. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:295-308.

Vigouroux C, Fajas L, Khallouf E et al. Human peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2: genetic mapping, identification of a variant in the coding sequence, and exclusion as the gene responsible for lipotrophic diabetes. *Diabetes* 1998;47:490-492.

Waterworth DM, Bennett ST, Gharani N et al. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 1997; Apr 5,349(9057):986-990.

Weeks DE, Lange K. The affected- pedigree member method of linkage analysis. *Am J Hum Genet* 1988;53:1127-1136.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;May 86(5):1930-1935.

World Health Organization Expert Committee. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation, part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization, 1999.

Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D jr. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 1979;282:503-505.

Wren AM, Small CJ, Ward HL et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000;141:4325-4328.

Wright A et al. A polygenic basis of late-onset disease. *Trends in Genetics* 2003;19(2):97-106.

www.diab.cz

Yamanuchi T, Kamon J, Waki H et al. The fat derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941-946.

Yamashida T, Mackay W, Rushforth N, Bennett P, Houser H. Pedigree analyses of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) in Pima Indians suggest dominant mode of inheritance. *Am J Hum Genet* 1984;36 (suppl.):183S (Abstract).

Yang X, Enerback S, Smith U. Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res* 2003;11(10):1182-1191.

Yokota T, Oritani K, Takahashi I et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000; Sep 1, 96(5):1723-1732.

Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ et al. Activation of AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo: Role of mitochondrial nitrogen species. *J Biol Chem* 2004; 279:43940-43951.

FACULTY OF SCIENCE, CHARLES UNIVERSITY
DEPARTMENT OF ANTHROPOLOGY AND HUMAN GENETICS

ENERGY METABOLISM CONTROL

SELECTED GENETIC AND HORMONAL FACTORS

SUMMARY OF PH.D. THESIS

PRAGUE 2007

RNDR. DANIELA VEJRAŽKOVÁ (ŠRÁMKOVÁ)

The submitted Ph.D. thesis finishes postdoctoral studies at the Faculty of Science, Charles University, Department of Anthropology and Human Genetics. The practical part of the work was done in the Institute of Endocrinology, Prague in the years 1999-2007 under external supervision of RNDr. Běla Bendlová, CSc.

Grant support: IGA MH CR NB/5395-5, IGA MH CR NB/7391-3, IGA MH CR NR/7809-5, COST OC.B17.10, GA CR 301/04/1085.

CONTENTS

	page
1. Introduction.....	4
1.1 Type 2 diabetes mellitus.....	4
1.2 Obesity and metabolic syndrome.....	5
1.3 Polycystic ovary syndrome.....	5
2. Aims and conception.....	7
3. Abstracts of publications 1-9.....	9
4. Conclusions.....	20
5. References.....	22

1. INTRODUCTION

The human body requires nutrients sufficient to provide free energy to manufacture the daily requirement of high energy phosphate (mainly ATP, adenosine triphosphate) and reducing equivalents needed to power all body functions. Energy-yielding nutrients are provided by dietary carbohydrate, fat, and protein in varying proportions among different human populations. Under conditions of caloric balance, energy intake equals energy expenditure. Dietary excess has been associated with obesity, type 2 diabetes mellitus (DM2), metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome (PCOS). These complex metabolic disorders form the main subject fields discussed in the submitted Ph.D. thesis.

1.1 Type 2 diabetes mellitus

At present, the type 2 diabetes mellitus (DM2) is the most common type of diabetes. The pathophysiology of glucose intolerance in DM2 involves both genetic and environmental factors (DeFronzo 1997), especially weight control (Kelley 1995) and physical activity (Schneider, Morgado 1995). Before the onset of postprandial and fasting hyperglycemia, individuals genetically predisposed to develop DM2 are known to be resistant to the action of insulin (Pratipanawatr et al. 2001, Tripathy et al. 2000, Jackson et al. 2000, Gulli et al. 1992). Nevertheless, glucose level remains normal because of a marked increase in insulin secretion by pancreatic beta cells (Pratipanawatr et al. 2001, Tripathy et al. 2000, Jackson et al. 2000, Diamond et al. 1993). The progression from impaired glucose tolerance to overt DM2 is associated with the inability of the pancreas to maintain its high insulin secretory rate (Kahn 2001, Weyer et al. 1999, Polonsky et al. 1996, Saad et al. 1989).

In the submitted work, genetic components of DM2 are studied, in particular three candidate genes that have been repeatedly described as most promising: PPARgamma2 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2), KCNJ11 (Potassium inwardly rectifying channel), and UCP1 (uncoupling protein 1).

Furthermore, the Ph.D. thesis deals with adipocytokines, hormonal factors produced by adipose tissue, which are involved in maintaining energy balance and insulin sensitivity and which have drawn a considerable interest in recent years. Adipocytokines resistin,

adiponectin, and leptin together with gastric peptide ghrelin are discussed in the submitted work in connection with DM2.

1.2 Obesity and metabolic syndrome

The combination of the modern diet and sedentary lifestyle has resulted in an increase in obesity, insulin resistance, and dyslipidaemia, disorders that are features of the so-called metabolic syndrome or syndrome X, as defined by the Adult Treatment Panel (ATP III, 2001). Insulin resistance is thought to be a core defect in metabolic syndrome, but the exact relationship between insulin resistance and different features of syndrome X is unknown. Obesity, and in particular abdominal obesity, is a known risk factor for the development of abnormal glucose tolerance and symptoms of metabolic syndrome. Obesity has been considered to have a major genetic component. The high heritability for BMI (body mass index) and absolute weight as well as somewhat lower heritability for WHR (waist to hip ratio) are in accordance with this assumption (Cardon et al. 1994, Bouchard et al. 1990, Selby et al. 1990).

In the submitted Ph.D. thesis three candidate obesity genes, UCP1 (uncoupling protein 1), PPARgamma2 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2), and KCNJ11 (Potassium inwardly rectifying channel), as well as four adipocytokines (leptin, resistin, adiponectin and gastric peptide ghrelin) are discussed in relation with obesity and metabolic syndrome.

1.3 Polycystic ovary syndrome

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most commonly encountered endocrinopathies of women in fertile age with the incidence reported to be about 4-6% in white women (Azziz et al. 2004). Its exact pathogenesis remains unknown; the complex interplay between ovarian and adrenal androgen production, obesity, and insulin sensitivity is involved (Toprak et al. 2001, Dunaif, Finegood 1996, Dunaif et al. 1989). But, on the other hand, some studies do not confirm differences in insulin sensitivity in nonobese PCOS patients (Vrbikova et al. 2004, Morin-Papunen et al. 2000, Holte 1996, Ovesen et al. 1993). It has been also discussed whether PCOS itself could be another feature of syndrome X (Sam, Dunaif 2003). However, a surprisingly low number of women with metabolic syndrome have been shown to be affected by PCOS (Korhonen et al. 2001).

In the submitted work data regarding the levels of adipocytokines adiponectin, leptin, and gastric ghrelin in PCOS women are discussed in relation with obesity, insulin sensitivity, and metabolic syndrome.

2. AIMS AND CONCEPTION

The main aim of the submitted Ph.D. thesis is to contribute to the understanding of energy metabolism control in humans. A special attention is directed to the metabolism of glucose.

Several genetic and hormonal factors that, as to the current knowledge, play a key role in the control of human energy metabolism were selected and were studied in connection with metabolic disorders such as obesity, DM2, metabolic syndrome and PCOS.

Based on an international research, genes PPARgamma2, UCP1, and KCNJ11 represent the most promising candidate obesity and DM2 genes. Polymorphisms in these genes were genotyped and possible associations with anthropometric and biochemical parameters in the Czech population were investigated.

Hormonal factors such as leptin, resistin, and adiponectin belong to the family of the fat tissue hormones called adipocytokines. These hormones, together with the gastric enzyme ghrelin, play a crucial role in the neurohormonal regulation of the food intake and body weight.

The submitted Ph.D. thesis represents a set of nine publications provided with a detailed introduction, clinical and methodical part, and final conclusions. The enclosed publications consist of five original studies, four of them are published in international impacted journals. Four publications represent reviews that summarise current knowledge in the field.

Assumptions to fulfill the aims:

- 1) To complete large cohorts of DM2 patients, direct offspring of DM2 patients, obese subjects, group of women suffering from PCOS, and a sufficiently large group of control subjects
 - a. DNA bank completion
 - b. Detailed anthropometric and biochemical characterization of all subjects
- 2) To establish an electronic database
- 3) To establish and optimize molecular-genetic methodology of DNA analysis
 - a. PCR (polymerase chain reaction) method
 - b. RFLP (restriction fragment length polymorphism) method
 - c. SSCP (single strand conformational polymorphism) method
- 4) To genotype selected polymorphisms in candidate genes
- 5) Association analysis of genetic polymorphisms and /or studied enzyme concentrations with phenotypic features of the studied cohort of subjects
- 6) Statistical analysis of the obtained data
- 7) Publication of the results, conclusions, and interpretations

3. ABSTRACTS OF PUBLICATIONS 1-9

Publication 1. Šrámková D et al. [Gen PPAR γ ve středu zájmu obezitologů a diabetologů]. DMEV 2001;4(4):278-286. Czech.

Gene PPAR γ arouses interest of obesitologists and diabetologists.

¹Daniela Šrámková, ²Běla Bendlová, ³Marie Kunešová, ³Vojtěch Hainer

¹Department of Anthropology and Human Genetics, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic ²Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic ³Obesity Management Center, General Teaching Hospital, 3rd Medical Department, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Key words: peroxisome proliferators, PPARs, human obesity, type 2 diabetes mellitus, gene polymorphism, energy balance

Summary

The family of nuclear receptors, known as peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), plays a key role in energetic metabolism and in a process of adipogenesis. This review summarizes current knowledge about involvement of these receptors, especially the gamma form, in the complex metabolic pathways, with a special attention to carbohydrate metabolism. Gene polymorphisms in gamma form and their possible association with metabolic disorders such as obesity and type 2 diabetes mellitus are presented here.

Publication 2. Šrámková D et al. [Correlation of leptin and anthropometric parameters during weight reduction therapy in obese children]. *Sb Lek* 2002;103(4):487-94. Czech.

**Correlation of leptin and anthropometric parameters during weight reduction therapy
in obese children.**

Daniela Šrámková, Jiří Šrajer, Pavel Bláha

*Department of Anthropology and Human Genetics, Faculty of Science, Charles University,
Prague, Czech Republic*

Key words: obesity, leptin, reduction programme, body composition

Summary

At present, obesity is considered one of the major health problems. It is a predisposing factor of several chronic diseases including non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) and coronary heart disease (CHD). Leptin levels in humans have been found to be highly correlated with total adiposity. We performed statistic analysis in order to identify linkage between leptin levels and anthropometric parameters in a group of 285 Czech obese children (152 girls and 133 boys) aged 7 to 18 years. The children were measured using the standard anthropometric technique according to Martin and Saller at the beginning and end of a five-week therapeutic weight reduction programme. The skin fold thickness at 14 sites was assessed by means of Best calliper. The body composition was evaluated using Matiegka's technique. The leptin levels were investigated at the beginning and end of the reduction programme by direct enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). For the evaluation of the grade of obesity, body weight, BMI (body mass index), RI (Rohrer's index), FMI (fat mass index) and normalized body weight, normalized BMI a RI were plotted. Correlation analysis shows relation between leptin concentration and FMI to be the most significant. As to ponderal indexes, normalized RI shows the most significant positive correlation. Leptin concentrations are negatively correlated with the proportion of the weight of skeletal muscles by Matiegka both in girls and boys. Intersexual differences in correlations between leptin concentrations and normalized circumferences are observed, as well as in correlations between leptin and particular skin fold thickness. We also tested relations between the

magnitude of leptin decreases and magnitude of decreases of anthropometric parameters. There is a strong endorsement both in girls and boys of positive correlation between decrease of leptin concentration and fat reduction. Interestingly, differences between boys and girls in relations between leptin decrease and change in lean body mass had been observed.

Publication 3. Šrámková D 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 (IF 1.971) 2002 Jun;967:265-73.

Is a Pro12Ala polymorphism of the PPARgamma2 gene related to obesity and type 2 diabetes mellitus in the Czech population?

^{1,2}Daniela Šrámková, ³Marie Kunešová, ³Vojtěch Hainer, ¹Josef Včelák, ¹Běla Bendlová

¹*Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic* ²*Department of Anthropology and Human Genetics, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic* ³*Obesity Management Center, General Teaching Hospital, 3rd Medical Department, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic*

Key words: obesity in humans, type 2 diabetes mellitus, PPAR γ 2 gene, Pro12Ala polymorphism

Summary

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are member of the nuclear hormone receptor subfamily of transcription factors. PPAR γ 2 plays a key role in regulation of adipocyte differentiation and energy homeostasis. Numerous recent studies provide the evidence that the Pro12Ala polymorphism is linked to obesity and type 2 diabetes mellitus but the results are controversial and depend on the ethnicity. **Objectives:** The aim of this study was to determine allele frequencies and to study the influence of the polymorphism on biochemical and anthropometric parameters in healthy Czech adult population, in a group of type 2 diabetics and in a group of obese women. **Methods:** The Pro12Ala substitution was detected by PCR-RFLP method (Hga1). For statistical analyses, the NCSS 2000 program was used. **Results:** χ^2 test did not reveal significant differences in Pro12Ala frequency between the group of diabetic patients and controls. However, the occurrence of Pro12Ala tended to be higher in a group of obese women in comparison to the controls. The Mann-Whitney test revealed significantly lower fasting insulin and C-peptide levels in the Pro12Ala carriers in a group of diabetics even after adjustment for age, body mass index (BMI), and duration of

DM2. In obese women, higher waist to hip ratio (WHR) was found in subjects with the 12Ala allele. Taken all probands together, there were no differences in body constitution (BMI, WHR), body composition (%fat mass, %muscles, %bone mass), lipid levels or in other tested parameters between the Pro12Ala carriers and non-carriers. **Conclusions:** The frequency of the Pro12Ala PPAR γ 2 gene polymorphism in Czech probands is similar to other Central European populations. Frequency of the Pro12Ala substitution tends to be higher in obese women compared to the controls. The fasting insulin and C-peptide levels in the Pro12Ala carriers were significantly lower in the group of diabetic women. This finding provides evidence that polymorphism may influence glucose metabolism.

Publication 4. Šrámková D, Bendlová B. [Rezistin-klíč k inzulínové rezistenci?] DMEV 2002;5(4):225-228. Czech.

Resistin-the key to insulin resistance?

Daniela Šrámková, Běla Bendlová

Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

Key words: resistin, obesity, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus

Summary

The precise mechanism linking increased adiposity to insulin resistance remains unknown. A search for genes that are induced during adipocyte differentiation led to the identification of a unique protein with no homology to any known hormone or other signaling molecule. Based on mice studies observations, the protein was named resistin because of its antagonistic effect on insulin action. The expression of resistin is influenced by insulin, by stimulation of sympathetic nervous system and by PPAR γ agonists. The results of these several studies are controversial. In men the resistin is expressed more likely by mononuclear cells than by adipocytes. However, the most recent study confirmed the increased expression in visceral and abdominal subcutaneous fat. It is probable that resistin is included in regulations of glucose and lipid metabolism, the question regarding its physiological role in the organism as well as the pathophysiological role in the development of obesity and diabetes type 2 remains to be answered. This review summarizes main conclusions of animal and human studies performed on this topic in past two years.

Publication 5. Vrbikova J et al. Determinants of circulating adiponectin in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Invest* (IF 0.810) 2005;60(3):155-61.

Determinants of circulating adiponectin in women with polycystic ovary syndrome.

Jana Vrbíková, Kateřina Dvořáková, Martin Hill, Josef Včelák, Soňa Stanická, Markéta Vaňková, Daniela Šrámková, Karel Vondra, Běla Bendlová, Luboslav Stárka

Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

Key words: polycystic ovary, adiponectin, ghrelin, androgen, insulin resistance, euglycemic clamp

Summary

Background and aim: Adiponectin is regarded as a possible link between adiposity and insulin resistance. Ghrelin and leptin are considered as signals of energy status. We evaluated the relationships between these peptides, androgens and insulin sensitivity in women affected by polycystic ovary syndrome. **Methods:** Thirty-six women with PCOS were examined with euglycemic hyperinsulinemic clamp (to determine M/I, index of insulin sensitivity). Leptin, ghrelin, adiponectin, androgens, and SHBG were determined. Statistics was done using correlation analysis and backward stepwise multiple regression. **Results:** The positive correlation of adiponectin with testosterone remains significant even after adjustment for BMI ($p = 0.01$), M/I ($p = 0.009$) and for both M/I and BMI ($p = 0.02$). In multiple regression with testosterone, M/I, leptin and ghrelin as independent variables, the model including testosterone ($p = 0.03$) and ghrelin ($p = 0.002$) explained 49% of the variability ($p < 0.0012$) of adiponectin. **Conclusions:** Both adiponectin and ghrelin can be involved in the pathophysiology of PCOS but their relation must be delineated further.

Publication 6. Vrbikova J et al. Metabolic syndrome in young Czech women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod (IF 3.669) 2005 Dec;20(12):3328-32.

Metabolic syndrome in young Czech women with polycystic ovary syndrome.

¹Jana Vrbíková, ¹Karel Vondra, ²David Cibula, ¹Kateřina Dvořáková, ¹Soňa Stanická,
¹Daniela Šrámková, ³Gustav Šindelka, ¹Martin Hill, ¹Běla Bendlová, ³Jan Škrha

¹Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic, ²Department of Obstetrics and Gynecology, Charles University, Prague, Czech Republic, ³Department of Internal Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Key words: euglycaemic clamp, insulin resistance, metabolic syndrome, polycystic ovary

Summary

Methods: Sixty-nine young women with polycystic ovary syndrome (PCOS) [age 25.2 \pm 4.7 years, with body mass index (BMI) 24.3 \pm 4.8 kg/m²; mean \pm SD] and 73 age-matched healthy females (BMI 22.3 \pm 3.3 kg/m²; mean \pm SD) were evaluated for the occurrence of features of metabolic syndrome according to the Adult Treatment Panel III. **Results:** Overt metabolic syndrome (the presence of three and more risk factors) was not more common in PCOS women (1/64, 1.6%) than in healthy controls (0/73, 0%). On the other hand, in nearly 50% of PCOS women isolated features of metabolic syndrome, most often a decrease in high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, were found. Women with at least one feature of metabolic syndrome were, in comparison with women without any of these features, significantly more obese ($P = 0.0001$), with lower insulin sensitivity ($P = 0.05$). When comparing PCOS women according to the degree of insulin sensitivity, as determined by euglycaemic clamp, isolated features of metabolic syndrome were found in 8/17 women above the upper quartile, compared with 11/16 women below the lower quartile of insulin sensitivity ($P = 0.20$). **Conclusions:** Overt metabolic syndrome is only rarely encountered in young Czech females affected by PCOS but its isolated features are relatively frequent, both in young PCOS patients and in age-matched control women.

Publication 7. Šrámková D, Bendlová B. [Alterované draselné kanály beta buněk a jejich role v patogenezi diabetes mellitus 2. typu]. DMEV 2005;8(1):18-22. Czech.

Altered beta cell potassium channels and their role in type 2 diabetes mellitus.

Daniela Šrámková, Běla Bendlová

Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

Key words: type 2 diabetes mellitus, inwardly rectifying potassium channel, E23K polymorphism, pancreatic beta cell

Summary

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is generally perceived as a heterogeneous polygenic disorder influenced by both hereditary and environmental factors. Despite intensive investigations, little progress has been made in identifying genes that impart susceptibility to the common late-onset forms of the disease. Recently, genes encoding for components of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta cells have been widely considered as DM2 targets. These channels control insulin secretion by coupling metabolism to membrane electrical activity. The article summarizes knowledge concerning structure and function of the channels with respect to DM2. A common E23K polymorphism in the pore-forming subunit of the channels, which belongs to the most important genetic risk factors for DM2 yet identified, is discussed here.

Publication 8. Vejražková D, Bendlová B. [Two promising candidate genes in the etiopathogenesis of DM2 - PPARgamma2 and KCNJ11]. *Cas Lek Cesk* 2005;144(11):721-5. Czech.

**Two promising candidate genes in the etiopathogenesis of DM2:
PPARgamma2 and KCNJ11.**

Daniela Vejražková, Běla Bendlová

Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

Key words: type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, PPAR γ 2 gene, KCNJ11 gene, genetic polymorphism, glucose balance

Summary

Type 2 diabetes mellitus (DM2) represents a multifactorial disease – both genetic and environmental factors are implicated in its aetiology. In spite of the enormous effort that has been applied to the task, unravelling the genetics of DM2 has been problematic. A polygenic inheritance is proposed for most cases and more than 250 candidate genes have been studied. Recently increasing attention has been directed to two genes that have been repeatedly described in association with DM2: the PPAR γ 2 gene (peroxisome proliferator-activated receptor gamma2) and KCNJ11 (potassium channel inwardly rectifying). The PPAR γ 2 is a member of the nuclear hormone receptor subfamily of transcription factors. It plays a key role in regulation of adipocyte differentiation and energy balance. The KCNJ11 gene codes for a pore-forming subunit of the inwardly rectifying ATP sensitive K⁺ channel, which is involved in the direct regulation of insulin secretion. Here, recent knowledge regarding involvement of these two genes in complex metabolic pathways is summarized. In the whole review, we focus on the glucose homeostasis.

Publication 9. Sramkova D et al. The UCP1 gene polymorphism A-3826G in relation to DM2 and body composition in Czech population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (IF 1.196) 2007; Issue 2, in print.

The UCP1 gene polymorphism A-3826G in relation to DM2 and body composition in Czech population.

Daniela Šrámková, Šárka Krejbichová, Josef Včelák, Markéta Vaňková, Petra Šamalíková, Martin Hill, Hana Kvasničková, Kateřina Dvořáková, Karel Vondra, Vojtěch Hainer, Běla Bendlová

Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

Key words: type 2 diabetes mellitus, uncoupling protein 1, A-3826G polymorphism, insulin sensitivity, obesity in humans

Summary

Mitochondrial uncoupling contributes to the control of energy expenditure. The brown fat specific uncoupling protein 1 (UCP1) mRNA was detected in intraperitoneal and extraperitoneal adipose tissue in adult humans. The A-3826G polymorphism in the UCP1 gene promoter region was found to be associated with reduced mRNA expression indicating that the polymorphism is of functional importance. **Objective:** To determine allelic frequencies and genotypic distribution of the A-3826G polymorphism and to study its possible association with anthropometric parameters and biochemical markers of glucose and lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus (DM2) patients (n=295), in offsprings of DM2 patients (n=113), and in healthy adults without family history of DM2 (n=120). **Results and discussion:** In the whole cohort of 528 subjects, the G allele was observed with a frequency of 0.26. Genotypic distribution did not differ between diabetics and controls. However, in the offsprings of DM2 patients, significantly higher BMI and a trend towards higher waist to hip ratio, waist to height ratio, waist circumference, and subcutaneous fat mass was observed in the AG genotype compared with the wild-type. Similar tendency was evident in the control group. This indicates possible involvement of the A-3826G polymorphism in the regulation of body composition.

4. CONCLUSIONS

The postulated aim of the work was fulfilled:

- 1) Quite a large cohorts of DM2 patients, direct offspring of DM2 patients, and obese subjects as well as a group of women suffering from PCOS, and sufficiently large group of control subjects were completed
 - a. All the probands underwent a detailed anthropometric and biochemical characterization
 - b. The DNA bank was established and completed
- 2) An electronic database was established
- 3) Molecular genetic methods PCR, RFLP, and SSCP were established and optimized
- 4) Specific polymorphisms in the selected candidate genes were genotyped and unique data regarding genotypic frequencies of these polymorphisms in Czech population were obtained
- 5) Genetic, biochemical and anthropometric data underwent statistical analysis. Especially associations between genetic polymorphisms/adipocytokine concentrations and anthropometric/biochemical parameters were tested
- 6) Final results were evaluated and possible effect of the studied genetic polymorphisms and/or adipocytokines on body composition and/or biochemical status was assessed. Also an eventual involvement of the studied genetic and hormonal factors in aetiopathogenesis of obesity, DM2, metabolic syndrome, and PCOS was considered
- 7) Main results and conclusions of the research were published in scientific journals. The publications represent the pivotal part of the submitted Ph.D. thesis.

During the six years of research, interesting new observations were made regarding selected adipocytokines and their relations to biochemical metabolic markers and certain somatometric parameters. In case of leptin, its reaction to the intense changes in energy balance was followed. Furthermore, an association of several studied polymorphisms in candidate genes PPARgamma2, UCP1, and KCNJ11 with some anthropometric and clinical/biochemical parameters were described in Czech population.

These results indicate that selected genetic polymorphisms play a minor role in the aetiopathogenesis of DM2, obesity, and metabolic syndrome in the Czech population. Nevertheless, these observations contribute to a better understanding of the complex pathogenesis of these disorders, where genetic as well as environmental factors are involved. A lot of patience and time is needed to uncover a little part of so-called „genetic background“ of these complex metabolic disorders. Because the effect of a particular genetic polymorphism on biochemical markers and/or on body composition is usually weak, very large cohorts of subjects are necessary to prove statistical significance.

In spite of the relatively slow progress, it is essential to map genetic factors involved in pathogenesis of diseases such as obesity, DM2, and metabolic syndrome, that are increasing world-wide and have reached epidemic proportions in both developed and developing countries. Better understanding of genetic background may lead to a development of more effective and accurately targeted drugs (pharmacogenomic). Pharmacotherapy should be an integral part of the comprehensive management of these disorders together with diet, physical activity, and cognitive behavioral modification of lifestyle. Identification of genetic predisposing markers could increase a chance of successful prevention, since motivation and ability of the informed high risk subjects to follow the advised changes in lifestyle could strengthen.

5. REFERENCES

ATP III 2001. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285:2486-2497.

Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2745-9.

Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, Fournier G. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med.* 1990 May 24;322(21):1477-82.

Cardon LR, Carmelli D, Fabsitz RR, Reed T. Genetic and environmental correlations between obesity and body fat distribution in adult male twins. *Hum Biol.* 1994 Jun;66(3):465-79.

DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev* 1997;4:177-269.

Diamond MP, Jacobs R, Connolly-Howard M, DeFronzo RA. Glucose metabolism during the menstrual cycle: assessment by the euglycemic, hyperinzulinemic clamp technique. *J Reprod Med* 1993;38:417-421.

Dunaif A, Finegood DT. Beta-cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Mar;81(3):942-7.

Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes.* 1989 Sep;38(9):1165-74.

Gulli G, Ferrannini E, Stern M, Haffner S, DeFronzo RA. The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucose-tolerant offspring of two Mexican-American NIDDM parents. *Diabetes.* 1992 Dec;41(12):1575-86.

Holte J. Disturbances in insulin secretion and sensitivity in women with the polycystic ovary syndrome. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1996 Apr;10(2):221-47.

Jackson S, Bagstaff SM, Lynn S, Yeaman SJ, Turnbull DM, Walker M. Decreased insulin responsiveness of glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells from insulin-resistant nondiabetic relatives of type 2 diabetic families. *Diabetes.* 2000 Jul;49(7):1169-77.

Kahn SE. The importance of B-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4047-4058.

Kelley DE. Effects of weight loss on glucose homeostasis in NIDDM. *Diabetes Rev* 1995;3:366-377.

Korhonen S, Hippelainen M, Niskanen L, Vanhala M, Saarikoski S. Relationship of the metabolic syndrome and obesity to polycystic ovary syndrome: a controlled, population-based study. *Am J Obstet Gynecol.* 2001 Feb;184(3):289-96.

Morin-Papunen LC, Vauhkonen I, Koivunen RM, Ruukonen A, Tapanainen JS. Insulin sensitivity, insulin secretion, and metabolic and hormonal parameters in healthy women and women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2000 Jun;15(6):1266-74.

Ovesen P, Moller J, Ingerslev HJ, Jorgensen JO, Mengel A, Schmitz O, Alberti KG, Moller N. Normal basal and insulin-stimulated fuel metabolism in lean women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Dec;77(6):1636-40.

Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. Non-insulin-dependent diabetes mellitus: a genetically programmed failure of the B-cell to compensate for insulinresistance. *N Engl J Med* 1996;334:777-783.

Pratipanawatr W, Pratipanawatr T, Cusi K, Berria R, Adams JM, Jenkinson CP, Maezono K, DeFronzo RA, Mandarino LJ. Skeletal muscle insulin resistance in normoglycemic subjects with a strong family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation. *Diabetes.* 2001 Nov;50(11):2572-8.

Saad MF, Knowler WC, Pettitt DJ, Nelson RG, Mott DM, Bennett PH. Sequential changes in serum insulin concentration during development of non-insulin-dependent diabetes. *Lancet*. 1989 Jun 17;1(8651):1356-9.

Sam S, Dunaif A. Polycystic ovary syndrome: syndrome XX? *Trends Endocrinol Metab*. 2003 Oct;14(8):365-70.

Selby JV, Newman B, Quesenberry CP Jr, Fabsitz RR, Carmelli D, Meaney FJ, Slemenda C. Genetic and behavioral influences on body fat distribution. *Int J Obes*. 1990 Jul;14(7):593-602.

Schneider SH, Morgado A. Effects of fitness and physical training on carbohydrate metabolism and associated cardiovascular risk factors in patients with diabetes. *Diabetes Rev* 1995;3:378-407.

Toprak S, Yonem A, Cakir B, Guler S, Azal O, Ozata M, Corakci A. Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. *Horm Res*. 2001;55(2):65-70.

Tripathy D, Carlsson M, Almgren P, Isomaa B, Taskinen MR, Tuomi T, Groop LC. Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance: lessons from the Botnia Study. *Diabetes*. 2000 Jun;49(6):975-80.

Vrbikova J, Cibula D, Dvorakova K, Stanicka S, Sindelka G, Hill M, Fanta M, Vondra K, Skrha J. Insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2942-5.

Weyer C, Bogardus C, Pratley RE. Metabolic characteristic of individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance. *Diabetes* 1999;48:2197-2203.