

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Jakub Frey

**ROLA WYBRANYCH POLIMORFIZMÓW W BIAŁKACH
RECEPTOROWYCH W PATOGENEZIE CUKRZYCY TYPU 2,
PRZEDCUKRZYCOWYCH CECH ILOŚCIOWYCH
I OTYŁOŚCI W POPULACJI POLSKIEJ**

Praca doktorska

Promotor: Prof. zw. dr hab. med. Jacek Sieradzki
Kierownik Katedry i Kliniki Chorób Metabolicznych

Prace wykonano
w Katedrze Chorób Metabolicznych
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik: Prof. zw. dr hab. med. Jacek Sieradzki

*Mojemu Nauczycielowi,
Panu Profesorowi dr hab. n. med. Jackowi Sieradzkemu,
składam serdeczne podziękowania za stworzenie warunków
do prowadzenia badań oraz przygotowania tej rozprawy,
a także poświęcony mi czas oraz cenne uwagi i pomoc w jej redagowaniu.*

*Panu Dr. hab. n. med. Maciejowi Maleckiemu,
Kierownikowi Pracowni Genetycznej Katedry Chorób Metabolicznych
składam wyrazy wdzięczności za wprowadzenie w arkana genetyki
oraz nieocenioną pomoc okazałą na wszystkich etapach przygotowywania
tej pracy.*

*Panu Dr. n. med. Pawłowi Wołkowowi
serdecznie dziękuję za pomoc w opracowaniu statystycznym
wyników.*

*Całej mojej Rodzinie,
a przede wszystkim Żonie, Rodzicom i Dzieciom,
dziękuję za wyrozumiałość i wsparcie.*

1 SPIS TREŚCI

1	Spis treści.....	5
2	Wykaz skrótów.....	7
3	Wstęp.....	10
3.1	Wprowadzenie.....	10
3.1.1	Zarys epidemiologii cukrzycy typu 2.....	10
3.1.2	Zarys etiologii cukrzycy typu 2.....	11
3.2	Fizjologia metabolizmu węglowodanów.....	12
3.2.1	Fizjologia wydzielania insuliny.....	12
3.2.1.1	Podstawy mechanizmów wydzielania insuliny i jego regulacji.....	12
3.2.1.2	Rola inkretyn w regulacji wydzielania insuliny.....	15
3.2.2	Fizjologia działania insuliny.....	17
3.2.2.1	Zarys mechanizmów działania insuliny.....	17
3.2.2.2	Rola PPAR γ w regulacji insulinooporności.....	20
3.3	Podstawy patogenezy cukrzycy typu 2.....	22
3.3.1	Defekt wydzielania insuliny.....	22
3.3.1.1	Mechanizmy kompensacji insulinooporności i wyczerpania komórek β trzustki.....	22
3.3.1.2	Zaburzenia efektu inkretynowego.....	24
3.3.2	Insulinooporność.....	24
3.3.2.1	Definicja insulinooporności, szkic patogenezy zjawiska.....	24
3.3.2.2	Rola wolnych kwasów tłuszczowych w powstawaniu insulinooporności.....	27
3.4	Zarys genetyki cukrzycy typu 2.....	28
3.4.1	Przegląd wyników dotychczasowych badań genetycznego podłoża cukrzycy typu 2.....	28
3.4.2	Polimorfizm Pro12Ala genu PPAR γ a cukrzyca typu 2 i przedcukrzycowe cechy ilościowe.....	32
3.4.3	Potencjalna rola wariantów genetycznych receptora GLP1 (Gly168Ser i Phe260Leu) w patogenezie cukrzycy typu 2 i przedcukrzycowych cech ilościowych.....	35
3.4.4	Mutacja Pro115Gln a otyłość jako cecha przedcukrzycowa.....	35
4	Założenia pracy.....	37
5	Cel pracy.....	38
5.1	Ogólny cel pracy.....	38
5.2	Cele szczegółowe.....	38
6	Materiał i metodyka.....	39
6.1	Grupa badana.....	39
6.2	Izolacja DNA i genotypowanie.....	40
6.2.1	Genotypowanie polimorfizmu PPAR γ Pro12Ala.....	41
6.2.2	Genotypowanie polimorfizmu GLP1R Gly168Ser.....	41
6.2.3	Genotypowanie polimorfizmu GLP1R Phe260Leu.....	42

6.2.4	Genotypowanie mutacji PPAR γ Pro115Gln.....	43
6.3	Badania antropometryczne.....	44
6.4	Oznaczenia biochemiczne.....	44
6.5	Obliczenia wskaźników insulinowrażliwości i wydzielania insuliny.....	45
6.5.1	Ocena modelu homeostazy – oporności na insulinę i modelu homeostazy funkcji komórki β	45
6.5.2	Wskaźniki wrażliwości na insulinę i wydzielania insuliny (insulin sensitivity indices – ISI) oparte na glikemii i insulinemii w trakcie doustnego testu obciążenia 75g glukozy.....	46
6.6	Analiza statystyczna.....	46
7	Wyniki.....	48
7.1	Wyniki badania związku wybranych polimorfizmów z cukrzycą typu 2.....	48
7.1.1	Polimorfizm Pro12Ala genu PPAR γ	48
7.1.2	Polimorfizm Gly168Ser genu GLP1R.....	50
7.1.3	Polimorfizm GLP1R Phe260Leu.....	53
7.2	Wyniki badania związku wybranych polimorfizmów z przedcukrzycowymi cechami ilościowymi.....	55
7.2.1	Polimorfizm Pro12Ala w genie PPAR γ	55
7.2.2	Polimorfizm Gly168Ser w genie GLP1R.....	56
7.2.3	Polimorfizm Phe260Leu w genie GLP1R.....	58
7.3	Wyniki poszukiwania mutacji PPAR γ Pro115Gln u osób otyłych ze wskaźnikiem masy ciała ≥ 35	59
8	Dyskusja.....	61
8.1	Związek polimorfizmu Pro12Ala genu PPAR γ z cukrzycą typu 2.....	61
8.2	Związek polimorfizmu Gly168Ser genu GLP1R z cukrzycą typu 2.....	64
8.3	Związek polimorfizmu Phe260Leu genu GLP1R z cukrzycą typu 2.....	65
8.4	Związek wybranych polimorfizmów białek receptorowych z przedcukrzycowymi cechami ilościowymi.....	65
8.4.1	Związek polimorfizmu Pro12Ala genu PPAR γ z przedcukrzycowymi cechami ilościowymi.....	66
8.4.2	Związek polimorfizmów Gly168Ser i Phe260Leu genu GLP1R z przedcukrzycowymi cechami ilościowymi.....	67
8.5	Mutacja Pro115Gln genu PPAR γ a otyłość w badanej populacji.....	69
9	Wnioski.....	71
10	Streszczenie.....	72
11	Summary.....	75
12	Piśmiennictwo.....	78
Załącznik	79

2 WYKAZ SKRÓTÓW

ACTH – *adrenocorticotropic hormone* – hormon adrenokortykotropowy

ADD1/SREBP1 – *adipocyte determination and differentiation factor/sterol regulatory element-binding factor*
– czynnik determinacji i różnicowania adipocytów/białko wiążące się ze sterolowymi elementami regulatorowymi

ADP – *adenosine diphosphate* – dwufosforan adenozyne

ANP – *atrial natriuretic peptide* – przedsionkowy peptyd natriuretyczny

ATP – *adenosine triphosphate* – trójfosforan adenozyne

BMI – *body mass index* – wskaźnik masy ciała

C/EBP - *CCAATT enhancer binding proteins* – białka wiążące się z sekwencją wzmacniającą CCAATT

CODIP – *Cost of Diabetes Type 2 in Poland* – Koszt Cukrzycy Typu 2 w Polsce

CRH – *corticotropin-releasing hormone* – hormon uwalniający hormon kortykotropowy

DBI – *diazepam-binding inhibitor* – inhibitor wiążący się z diazepamem

FATP-1 – *fatty acid transporting protein-1* – białko transportujące kwasy tłuszczowe-1

FFA – *free fatty acids* – wolne kwasy tłuszczowe

GHRH – *growth hormone – releasing hormone* – hormon uwalniający hormon wzrostu

GLU – stężenie glukozy w osoczu

GLUT2 – *glucose transporter 2* – transporter glukozy 2

HNF – *hepatocyte nuclear factor* – hepatocytowy czynnik jądrowy

HOMA-%B - *homeostasis model assessment* – *β-cell function* – ocena modelu homeostazy - czynności komórki β

HOMA-IR – *homeostasis model assessment* – *insulin resistance* – ocena modelu homeostazy – oporności na insulinę

IAPP – *islet amyloid polypeptide* - amyлина

INS – stężenie insuliny we krwi

IPF – *insulin promoter factor* – czynnik promotora insuliny

K_{ATP} – kanały potasowe zależne od trójfosforanu adenozyiny

K_V – kanały potasowe zależne od potencjału

LDL – *low-density lipoproteins* – lipoproteiny o małej gęstości

LOD – *logarithm of odds* – logarytm z prawdopodobieństwa

log – logarytm dziesiętny

MAPK – *mitogen-activated protein kinase* – kinaza białkowa aktywowana mitogenami

MC4R – *melanocortin-4-receptor* – receptor melanokortyny 4

min – minuta

MODY – *maturity-onset diabetes of the young* – cukrzyca typu dorosłych u młodych

NATPOL PLUS – Nadciśnienie Tętnicze w Polsce Plus Zaburzenia Lipidowe i Cukrzyca

NRF – *nuclear respiratory factor* – jądrowy czynnik oddechowy

OGTT – *oral glucose tolerance test* – doustny test tolerancji glukozy

PCR – *polymerase chain reaction* – łańcuchowa reakcja polimerazy

PPAR – *peroxisome proliferator-activated receptor* – receptor aktywowany proliferatorami peroksysomów

PPG-1 - *glycogen-associated protein phosphatase – 1* – związana glikogenem fosfataza białkowa – 1

PPP1R3A – *protein phosphatase 1 regulatory subunit-3A* – podjednostka regulatorowa 3 fosfatazy białkowej 1A

PPRE – *PPAR response elements* – sekwencje DNA łączące się z receptorami PPAR

QUICKI – *quantitative insulin sensitivity check index* – ilościowy wskaźnik insulinowrażliwości

RFLP – *restriction fragments length polymorphism* – zmienna długość fragmentów restrykcyjnych

RXR – *retinoid X receptor* – receptor retinoidów X

sqr – pierwiastek kwadratowy

SUR1 – *sulphonylurea receptor 1* – receptor sulfonilomocznika 1

TNF α – *tumor necrosis factor α* – czynnik martwicy guza α

TRH – *thyrotropin-releasing hormone* – hormon uwalniający hormon tyreotropowy

UTR – *untranslated region* – region nieulegający translacji

VDCC – *voltage-dependent calcium channels* – kanały wapniowe zależne od potencjału

VIP – *vasoactive intestinal peptide* – wazoaktywny peptyd jelitowy

VLDL – *very low-density lipoproteins* – lipoproteiny o bardzo małej gęstości

3 WSTĘP

3.1 Wprowadzenie

3.1.1 Zarys epidemiologii cukrzycy typu 2

Mianem cukrzycy określa się grupę chorób metabolicznych o zróżnicowanej etiologii cechujących się przewlekłą hiperglikemią. Do ich obrazu należą zaburzenia metabolizmu węglowodanów, tłuszczów i białek. Chorzy na cukrzycę zagrożeni są rozwojem przewlekłych powikłań zarówno makroangiopatycznych, jak i mikroangiopatycznych, mogących prowadzić do inwalidztwa i przedwczesnego zgonu, a w wymiarze społecznym wiążących się z wysokimi kosztami leczenia i kosztami pośrednimi. W roku 2000 na świecie żyło około 171 milionów chorych na cukrzycę, a przewiduje się, że w roku 2030 liczba ta wzrośnie do 366 milionów. W Polsce w roku 2000 żyło 2 miliony chorych na cukrzycę, ich ilość w roku 2030 jest szacowana na 4 miliony. Na te liczby w ponad 85% składają się chorzy na cukrzycę typu 2. W ostatnich czterech dekadach chorobowość z jej powodu wzrosła o 150 – 300%. Dodatkowym czynnikiem, który spowodował zwiększenie liczby chorych na cukrzycę typu 2 były zmiany kryteriów rozpoznania cukrzycy. Choruje 5-7% populacji świata. Ilość chorych będzie się zwiększać z wielu powodów: starzenia się populacji, obniżenia się średniej wieku rozpoznania, zmniejszenia umieralności, w końcu przewidywanego znacznego zwiększenia zachorowalności.

W Polsce również notuje się zwiększenie częstości występowania cukrzycy typu 2. W pierwszych krajowych badaniach epidemiologicznych, wykonanych w latach 60. ubiegłego wieku, oceniano chorobowość na 0,45 – 1,6% (, cytowane według). W badaniu Screen – Pol, przeprowadzonym w 1998r. w 12 ośrodkach regionalnych, obejmującym 30000 chorych powyżej 45 roku życia, zgłaszających się do lekarza podstawowej opieki wyniosła ona 13,3%. W badaniu NATPOL-PLUS, wykonanym w Gdańsku w 2002r. wśród 3051 Polaków w wieku od 18 do 94 lat – 5,6%. Wśród mieszkańców Wrocławia między 55 a 75 rż. – 6,1% (cukrzyca typu 2 rozpoznana po raz pierwszy) i 4,8% (znana wcześniej).

Według danych, uzyskanych w ramach Polskich Wieloośrodkowych Badań nad Epidemiologią Cukrzycy, chorobowość z powodu cukrzycy w Krakowie wyniosła 10,77%, przy czym u 5,66% chorych była to cukrzyca znana, a u 5,11% - świeżo wykryta. Nieprawidłowa tolerancja glukozy występowała u 14,5% badanych.

Epidemia cukrzycy typu 2 wiąże się z dużymi kosztami społeczno – ekonomicznymi. Według obliczeń, dokonanych na podstawie kwestionariuszy wypełnianych przez chorych na cukrzycę i lekarzy w programie CODIP w roku 2002, roczne koszty bezpośrednio leczenia jednego pacjenta (wizyt lekarskich, leków, innych konsultacji, hospitalizacji, transportu) wyniosły prawie 2500 PLN. Autorzy publikacji oszacowali koszty leczenia wszystkich chorych w Polsce na ponad 2 600 000 000 PLN – 8% nakładów poniesionych na służbę zdrowia w tym roku. Szacowane koszty pośrednie wyniosły około 6700 PLN na pacjenta na rok .

Coraz powszechniejsze występowanie, poważne zagrożenia wynikające z powikłań i duże koszty społeczno – ekonomiczne czynią cukrzycę typu 2 ważnym problemem medycznym i społecznym.

Rośnie rola badań genetycznych w diagnostyce cukrzycy. Po pierwsze, mogą one wskazać na jej określony typ i odpowiednio ukierunkować leczenie (farmakogenetyka) oraz dalszą obserwację, po drugie, być może w przyszłości będą służyć jako badania przesiewowe, wskazujące osoby, u których się ona rozwinie, jeszcze przed wystąpieniem hiperglikemii .

3.1.2 Zarys etiologii cukrzycy typu 2

W patogenezie choroby grają rolę zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe. Na wpływ tych pierwszych wskazują: częstsze występowanie choroby wśród krewnych chorych na cukrzycę typu 2 , wysokie odsetki zgodności (*concordance rates*) występowania choroby u bliźniąt jednojajowych oraz większe odsetki zgodności występowania choroby u bliźniąt monozygotycznych niż dzygotycznych , w końcu przypadki, w których zidentyfikowano geny odpowiedzialne za wystąpienie choroby, zaliczanej wcześniej do typu 2, a obecnie do innych określonych typów cukrzycy .

Z drugiej strony, istnieją silne dowody na wpływ czynników środowiskowych. Odsetki zgodności występowania cukrzycy typu 2 u monozygotycznych bliźniąt, jakkolwiek duże, nie sięgają stu procent. Do dużego wzrostu zachorowalności dochodzi w populacjach imigrantów do krajów o zachodnim typie żywienia . Przez zmiany trybu życia (zwiększenie aktywności fizycznej i zmianę nawyków żywieniowych) można zapobiec przejściu nietolerancji glukozy w cukrzycę typu 2 .

3.2 Fizjologia metabolizmu węglowodanów

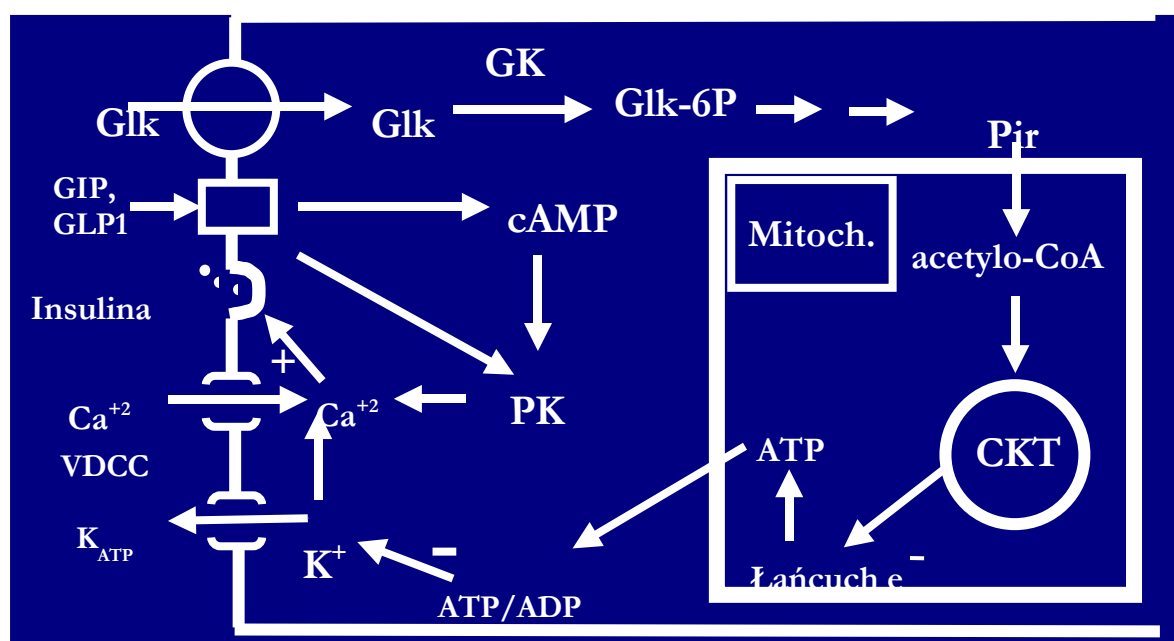
3.2.1 Fizjologia wydzielania insuliny

3.2.1.1 Podstawy mechanizmów wydzielania insuliny i jego regulacji

Insulina wydzielana jest w odpowiedzi na wiele bodźców, z których najważniejszym jest zwiększenie stężenia glukozy w krwi krążącej. Sekrecja tego hormonu wyzwalana jest przez kilka mechanizmów: jonowych, zależnych od trójfosforanu adenozyliny (ATP) i niejonowych, niezależnych od ATP.

W mechanizmie jonowym, który zdaje się mieć podstawowe znaczenie, kluczową rolę odgrywa zależny od ATP kanał potasowy (K_{ATP}). Glukoza, wnikając do komórki β trzustki przy pomocy transportera GLUT2, ulega fosforylacji do glukozy-6-fosforanu (reakcja katalizowana przez glukokinazę) i wchodzi w łańcuch przemian glikolizy. Od tej reakcji zależy szybkość przebiegu przemian całego szlaku metabolicznego, stąd glukokinaza nazywana bywa „czujnikiem glukozy” komórki β . Powstające produkty, głównie pirogronian, są z kolei substratami zachodzących w mitochondriach przemian łańcucha oddechowego, które prowadzą do powstania większości ATP z metabolizmu glukozy. Zwiększenie stosunku ATP/ADP w komórce powoduje zamknięcie kanałów potasowych zależnych od ATP (K_{ATP}) i depolaryzację komórki. K_{ATP} jest oktamerem złożonym z 4 podjednostek Kir6.x (w komórce β Kir6.2) i 4 podjednostek SUR1. Przyłączenie ATP do Kir6.2 skutkuje zamknięciem kanału, zahamowaniem wypływu przez błonę komórkową jonów potasu i depolaryzacją komórki. Ta z kolei wywołuje otwarcie kanałów wapniowych zależnych od potencjału (*voltage-dependent calcium channels* - VDCC), co stanowi bezpośredni bodziec do egzocytozy insuliny z ziarnistości komórek β . Mechanizm wydzielania insuliny przedstawiony został schematycznie na rycinie 1.

Ryc. 1. Mechanizm wydzielania insuliny przez komórki β trzustki. Glk – glukoza, GK – glukokinaza, Glk-6-P, glukoza-6-fosforan, Pir – pirogronian, CKT – cykl kwasów trójkarboxylowych (Krebsa), acetylo-CoA – acetylokoenzym A, cAMP – cykliczny monofosforan adenozy, PK – kinazy białkowe, GLP1 – glukagonopodobny peptyd 1, GIP – zależny od glukozy peptyd insulinotropowy. Dla uproszczenia na schemacie przedstawiono jeden receptor inkretyn, w rzeczywistości GIP i GLP1 działają przez osobne receptory (według, zmodyfikowane)



Do repolaryzacji komórek β dochodzi przez otwarcie kanałów potasowych zależnych od potencjału (K_v).

Oprócz glukozy także inne czynniki wpływają na wydzielanie insuliny z komórki β . Należą do nich hormony produkowane przez komórki wysp trzustkowych (glukagon), inne peptydy, znajdujące się w tych komórkach, klasyczne i peptyderygiczne neuroprzekaźniki z zakończeń unerwiających wyspy Langerhansa i hormony wydzielane przez gruczoły dokrewne (hormon uwalniający hormon tyreotropowy – *thyrotropin-releasing hormone* – TRH, hormon uwalniający hormon wzrostu – *growth hormone-releasing hormone* – GHRH, hormon adrenokortykotropowy – *adrenocorticotrophic hormone* – ACTH i opioidy) oraz przez komórki jelit, wchodzące w skład osi jelitowo – trzustkowej (zależny od glukozy peptyd insulinotropowy –

glucose-dependent insulintropic peptide – GIP, cholecystokina, opioidy, wazoaktywny peptyd jelitowy – *vasoactive intestinal peptide* – VIP, peptydy glukagonopodobne – *glucagon-like peptides* – GLP), składniki pokarmowe (np. aminokwasy - arginina, leucyna). Niektóre z nich wzmagają odpowiedź komórki β na glukozę (hormony osi trzustkowo – jelitowej) inne (np. arginina, leucyna) zwiększają wydzielanie insuliny niezależnie od glukozy. Także stymulacja przywspółczulna wywołuje sekrecję insuliny .

Mechanizmy wewnątrzkomórkowe, w jakich działają wymienione substancje, często nie zostały do końca poznane. W wypadku argininy przypuszcza się, że wniknięcie do komórki β dodatnio naładowanych cząsteczek tego aminokwasu powoduje jej depolaryzację, wywołując otwarcie kanałów VDCC, jak to opisano powyżej. Podczas metabolizmu leucyny powstaje ATP, co może wywołać otwarcie kanałów K_{ATP} .

Do drugich przekaźników mogących mieć znaczenie w stymulacji wydzielania insuliny należą również: cykliczny AMP i zależne od cAMP kinazy białkowe; fosfolipidy i trójfosfoinozytol; kwas arachidonowy, przypuszczalnie odgrywający rolę w fuzji ziarnistości z insuliną z błoną komórkową. Z dotychczas zgromadzonych dowodów wynika, iż te mechanizmy nie zapoczątkowują wydzielania insuliny, lecz odpowiadają za jego nasilenie .

Działanie wielu hormonów, peptydów i neurotransmiterów jest mediowane przez receptory związane z białkami G, uruchamiającymi kaskady cykazy adenyłowej i fosfolipazy C. Aktywacja pierwszej z nich prowadzi do powstania cyklicznego AMP. Związek ten hamuje gromadzenie jonów wapnia w zbiornikach wewnątrzkomórkowych oraz aktywuje kinazę białkową A, co prowadzi do fosforylacji białek, odpowiadającą za ich uwrażliwienie na wapń, oraz kanałów wapniowych zależnych od potencjału (VDCC). Fosforylacja tych ostatnich zwiększa napływ wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Do podobnych skutków prowadzi aktywacja kaskady fosfolipazy C. Enzym ten katalizuje hydrolizę dwufosforanu fosfatydyloinozytolu na trójfosfoinozytol, hamujący sekwestrację jonów wapnia w zbiornikach wewnątrzkomórkowych i diacyloglicerol, aktywujący kinazę białkową C, katalizującą fosforylację białek, zwiększającą wrażliwość komórki na te jony .

Do czynników hamujących wydzielanie insuliny zaliczamy: pobudzenie współczulne oraz substancje takie, jak: adrenalina, noradrenalina, somatostatyna, pankreostatyna, neuropeptyd Y, amylna (*islet amyloid polypeptide* – IAPP), inhibitor wiążący się z diazepamem – *diazepam-binding inhibitor* – DBI, peptyd YY, hormon uwalniający kortykotropinę – *corticotropin-releasing hormone* – CRH, przedsionkowy peptyd natriuretyczny – *atrial natriuretic peptide* – ANP, aminy biogenne.

3.2.1.2 Rola inkretyn w regulacji wydzielania insuliny

3.2.1.2.1 *Pojęcie inkretyny, efekt inkretynowy*

Inkretynami nazywamy hormony wydzielane przez komórki jelit, które wywołują efekt inkretynowy – nasilenie wydzielania insuliny po doustnym podaniu glukozy w porównaniu z podaniem dożylnym. (Po podaniu ilości glukozy wywołującej pewien wzrost glikemii doustnie wydzielane jest około trzy- czterokrotnie więcej insuliny niż po podaniu dożylnym, powodującym ten sam przyrost glikemii). Stanowią one część osi jelitowo – trzustkowej, zapewniającej regulację funkcji wewnątrzwydzielniczej części trzustki przez napływające do niej z jelit po spożyciu mieszanego posiłku substraty (glukozę), impulsy nerwowe i hormony.

Wiele hormonów produkowanych w przewodzie pokarmowym, zwłaszcza należących do rodziny glukagonu i sekretyny, nasila wywołane przez glukozę wydzielanie insuliny. Działanie takie wykazuje np. sekretyna, jakkolwiek, ponieważ nie jest wydzielana w odpowiedzi na pojawienie się glukozy w dwunastnicy, nie zalicza się do inkretyn w ścisłym znaczeniu.

Do tej samej rodziny peptydów należą dwa związki, wydzielane w odpowiedzi na doustne podanie glukozy: zależny od glukozy peptyd insulinotropowy (GIP) i glukagonopodobny peptyd – 1 (GLP1).

3.2.1.2.2 *Zależny od glukozy peptyd insulinotropowy (GIP)*

Zależny od glukozy peptyd insulinotropowy (GIP) jest wydzielany przez komórki K jelit. Występują one w całym jelicie cienkim, w największej gęstości w dwunastnicy. Jest 42 – aminokwasowym peptydem, powstającym w wyniku obróbki prekursora o długości 153 aminokwasów. W komórce β GIP za pośrednictwem receptora sprzężonego z białkami G powoduje aktywację cykazy adenylowej i przez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP wywołuje zwiększenie stężenia wapnia w cytoplazmie i nasila egzocytozę insuliny. Aktywowane są także (być może wtórnie do zwiększenia ilości cAMP w komórce) inne drogi przekazywania sygnału: przez kinazę białkową aktywowaną mitogenami (mitogen-activated protein kinase – MAPK), 3-kinazę fosfatydyloinozytolu i kinazę białkową B.

Wydzielanie GIP jest stymulowane przez wchłanianie węglowodany i lipidy. Po posiłkach jego stężenie w surowicy rośnie od 10 do 20 razy.

Działanie GIP jako inkretyny zostało udowodnione na wiele sposobów: w odczynach immunoneutralizacji a także przy użyciu amidu (7-30)GIP, będącego antagonistą receptora GIP oraz przeciwciał anti-GIP. Wszystkimi tymi metodami spowodowano zmniejszenie wydzielania insuliny w odpowiedzi na doustne podanie glukozy i nietolerancję glukozy.

Z drugiej strony odkryto również, iż GIP nie jest jedyną inkretyną. W badaniach opartych na odczynach immunoneutralizacji wykazano obecność w wyciągu z jelit innych silnych stymulatorów wydzielania insuliny. Ponadto u chorych po resekcji różnych odcinków jelita nie stwierdzono korelacji między siłą efektu inkretynowego a wielkością wydzielania GIP.

3.2.1.2.3 *Glukagonopodobny peptyd-1 (GLP1) i receptor glukagonopodobnego peptydu-1 (GLP1R)*

Glukagonopodobny peptyd-1 (GLP1) jest drugą inkretyną, której wydzielanie w dystalnej części jelita cienkiego stwierdzono w wyżej opisanych eksperymentach (u ludzi zdrowych może mieć miejsce również w części proksymalnej). GLP1 stanowi produkt genu glukagonu. Ekspresja tego genu zachodzi nie tylko w komórkach α wysp trzustkowych, lecz także w komórkach L śluzówki jelit. W nich w wyniku obróbki pierwotnego produktu translacji, proglukagonu, powstają z jego C – terminalnego końca dwa peptydy glukagonopodobne: GLP1 i GLP2. Oba wykazują około 50% homologię sekwencji z glukagonem. Część N – końcowa, zawierająca sekwencję aminokwasów glukagonu, wydzielana w całości, nosząca nazwę glicentyny, jest prawdopodobnie nieaktywna biologicznie. Pewna ilość glicentyny trawiona jest dalej z oddzieleniem peptydu oksyntomoduliny. Składa się on z sekwencji aminokwasów glukagonu oraz dodatkowych ośmiu C – końcowych reszt aminokwasowych glicentyny. Ma właściwości insulinotropowe, jednak jego stężenie jest prawdopodobnie zbyt małe, aby miało ono znaczenie dla wydzielania insuliny w warunkach fizjologicznych. Ostatnio jednak oksyntomodulina wzbudziła zainteresowanie ze względu na swoje działanie hamujące apetyt.

Glukagonopodobny peptyd – 1 jest wydzielany w odpowiedzi na pojawienie się składników odżywczych w świetle jelit (być może także przez inne mechanizmy hormonalne lub nerwowe) a jego wydzielanie w ciągu doby koreluje ściśle z wydzielaniem insuliny. Jest on jedną z najsilniejszych znanych substancji uwalniających insulinę. W badaniach z wykorzystaniem antagonisty receptora GLP1, eksendyny (9-39), prowadzonych na zwierzętach udowodniono, iż peptyd ten jest w znacznej części odpowiedzialny za wydzielanie insuliny spowodowane doustnym podaniem glukozy, a w eksperymentach z ludźmi potwierdzono jego zasadnicze znaczenie dla tolerancji węglowodanów.

Receptor glukagonopodobnego peptydu-1 jest receptorem błonowym, składającym się z 463 aminokwasów, o siedmiu przezbłonowych domenach, związanym z białkiem G_s i kinazą białkową A. Może być też związany z innymi białkami G i działać za pośrednictwem kinazy białkowej aktywowanej mitogenami. Należy do receptorów klasy B, obejmującej także receptory dla GLP-2, GIP i sekretyny. Wykazuje również homologię sekwencji z receptorami

parathormonu i kalcytoniny. W obrębie części N - końcowej białka znajduje się miejsce wiążące ligand .

3.2.2 Fizjologia działania insuliny

3.2.2.1 Zarys mechanizmów działania insuliny

Receptor insuliny jest glikoproteiną przezbłonową o masie cząsteczkowej ok. 400 kDa. Składa się z dwóch podjednostek α po 135 kDa i dwóch podjednostek β po 95 kDa. Obie powstają z jednego proreceptora, kodowanego przez gen na ramieniu krótkim chromosomu 19. Łączą się mostkami dwusiarczkowymi, tworząc heterotetramer. Funkcjonuje on jako zależna od insuliny specyficzna dla reszt tyrozynowych kinaza białkowa. Podjednostka α jest całkowicie pozakomórkowa, natomiast podjednostka β ma domenę zewnątrzkomórkową, przezbłonową i wewnątrzkomórkową. Obie są glikoproteinami – pozbawienie ich reszt cukrowych zmniejsza zdolność receptora do wiązania insuliny. Podjednostka α wiąże insulinę z dużym powinowactwem i bardzo swoiście. Hamuje ona, jeśli nie jest związana z hormonem, aktywność kinazy tyrozynowej podjednostki β . Związanie insuliny z podjednostką α powoduje zmiany konformacyjne, odhamowujące działanie kinazy tyrozynowej podjednostki β . Ta ulega autofosforylacji w miejscu minimum sześciu reszt tyrozynowych, co wzmacnia jej funkcję kinazy, pozwala na fosforylację substratów wewnątrzkomórkowych oraz odgrywa rolę w internalizacji kompleksu insulina – receptor. Zidentyfikowano co najmniej 9 wewnątrzkomórkowych białek podlegających fosforylacji przez kinazę receptora insuliny (oraz insulinopodobny czynnik wzrostu-1 – *insulin-like growth factor-1* – IRS-1), z których 4 należą do rodziny substratów receptora insuliny (*insulin receptor substrate* – IRS).

Najlepiej scharakteryzowanym z nich jest substrat receptora insuliny – 1. Jest to białko cytoplazmatyczne o masie cząsteczkowej 131 kDa. Jest kodowany przez gen na ramieniu długim chromosomu 2. Występuje w wielu tkankach i wydaje się odgrywać rolę w rozwoju i różnych stanach fizjologicznych. IRS-1 ma 22 potencjalne miejsca fosforylacji tyrozyny. Reakcja ta zachodzi szybko po stymulacji receptora insuliną. Powoduje ona niekowalencyjne wiązanie IRS-1 do specyficznych domen białek wewnątrzkomórkowych (*src homology 2* – SH2), co umożliwia przekazanie sygnału. Sposób jego przekazania nie jest do końca poznany. W wypadku 3 - kinazy fosfatydyloinozytolu i fosfatazy fosfotyrozyny SHPTP2, przyłączenie IRS-1 do ich domen SH2 powoduje gwałtowne nasilenie ich aktywności enzymatycznej. Inne białka zawierające domeny SH2, jak GRB-2, nie mają takiej aktywności, ale łączą drogę przekazywania

sygnału z IRS-1 z innymi, takimi jak układ ras. Białko ras (p21ras) odgrywa rolę w regulacji wzrostu i metabolizmu komórek, pozostając związane z dwufosforanem guanozyny (nieaktywne) lub trójfosforanem guanozyny – insulina zmienia stosunek tych form na korzyść aktywnej. W reakcji tej biorą udział: czynnik zmieniający nukleotydy guanylowe – SOS i białko adaptorowe GRB-2. Po stymulacji insuliną ufosforylowany IRS-1 łączy się z domeną SH2 GRB-2, to zaś z czynnikiem mSOS. Ten kompleks przyłącza się do białka ras, wywołując jego aktywację i kaskadę fosforylacji przez kinazy serynowo/treoninowe, co ostatecznie prowadzi do uczynnienia kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (*mitogen – activated protein kinase – MAPK*) i kinazy pp90 S6. Kinaza pp90 S6 aktywuje związaną z glikogenem fosfatazę białkową – 1 (*glycogen-associated protein phosphatase – 1, PPG-1*). Defosforylowany PPG-1 uczynnia syntazę glikogenu, kinazę fosforylasy i fosforylazę glikogenu, łącząc pobudzenie receptora błonowego z łańcuchami reakcji istotnymi dla metabolizmu węglowodanów.

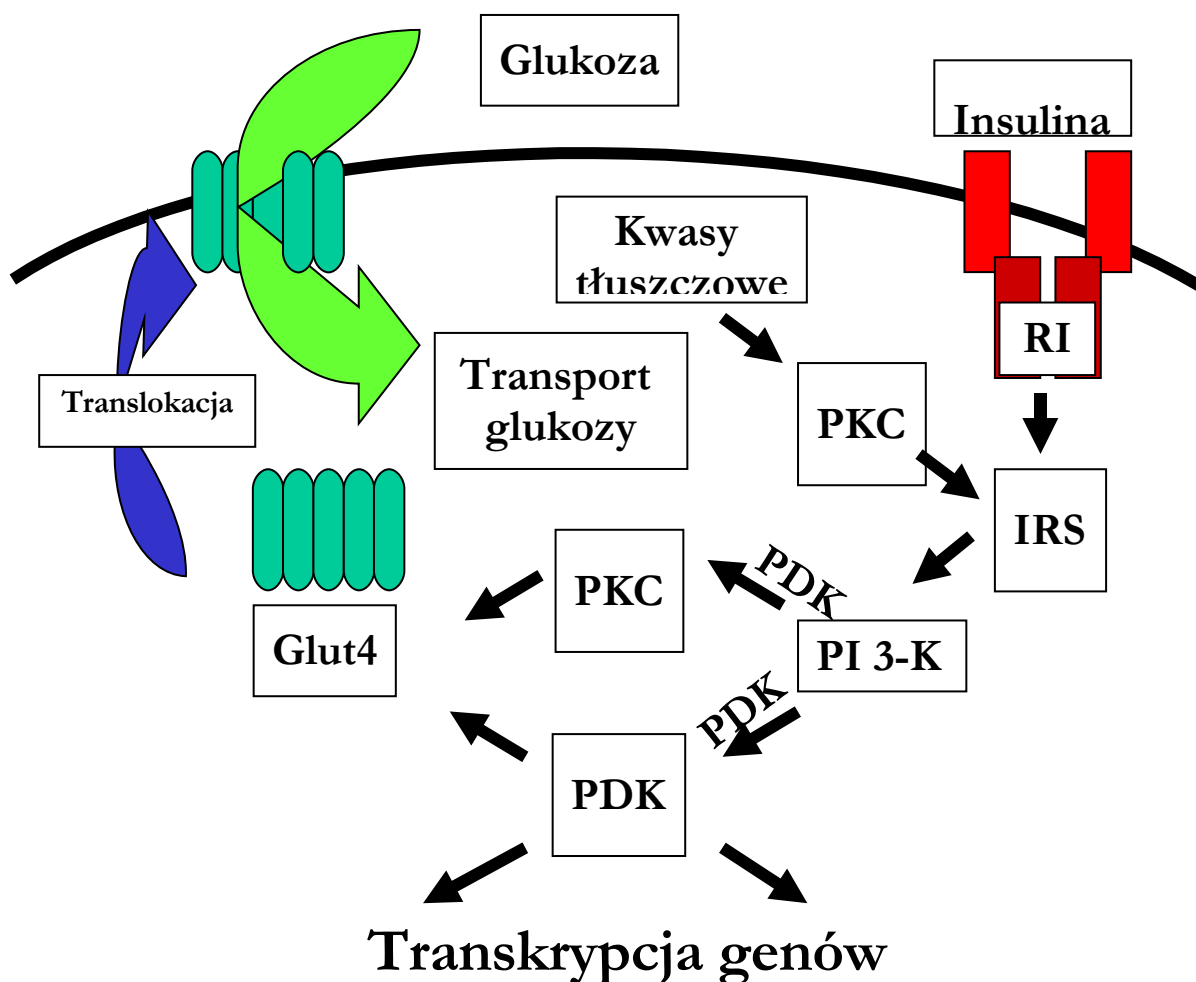
Alternatywne drogi przekazywania sygnału z receptora insuliny, o mniejszym znaczeniu, obejmują fosforylację innych białek cytoplazmatycznych: substratów receptora insuliny - 2 - 4 i białka Shc, które w ufosforylowanej formie tworzy kompleks z GRB i SOS, zwiększając ilość białka ras związanego z GTP. Ta ostatnia reakcja zachodzi również przy braku fosforylacji IRS, jest jednak wolniejsza, gra zatem zapewne niewielką rolę w przekazywaniu sygnału z receptora insuliny w warunkach fizjologicznych. Ogólny schemat kaskady sygnału receptora insuliny został przedstawiony na rycinie 2.

Skutkiem działania systemu wtórnych przekaźników są zróżnicowane efekty metaboliczne hormonu. W zakresie przemiany węglowodanów - nasilenie transportu glukozy przez błony komórkowe (za pośrednictwem fosforanu fosfatydyloinozytolu), glikolizy (przez stymulację heksokinazy, fosfofruktokinazy) oraz tlenowego metabolizmu glukozy (stymulacja dehydrogenazy pirogronianowej, syntazy cytrynianowej). Insulina przyspiesza również metabolizm glukozy w cyklu pentozowym przez wpływ na dehydrogenazę fosfoglukonianu. Hormon ten nasila także syntezę glikogenu stymulując syntazę glikogenową. W zakresie metabolizmu tłuszczów: przyspiesza hydrolizę trójglicerydów lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (*very low density lipoproteins – VLDL*) i chylomikronów (zwiększa syntezę i aktywność lipazy lipoproteinowej śródbłonna naczyń włosowatych), stymuluje wtórną estryfikację powstałych wolnych kwasów tłuszczowych do trójglicerydów oraz hamuje lipazę wewnątrzkomórkową, głównie w tkance tłuszczowej. W wątrobie nasila produkcję VLDL, a hamując lipazę wątrobową zmniejsza produkcję małych gęstych lipoprotein o małej gęstości (*low density lipoproteins – LDL*). Zwiększa produkcję cholesterolu przez stymulację reduktazy

hydroksymetyloglutarylo-koenzymu A oraz hamowanie esterazy cholesterolowej. Nasila produkcję kwasów tłuszczowych, aktywując karboksylazę acetylo-CoA oraz pośrednio przez zwiększenie podaży pochodzącego z glikolizy glicerolo-3-fosforanu.

W zakresie przemiany białkowej insulina działa anabolicznie, stymulując syntezę białek przez zwiększenie transportu aminokwasów do komórek, przyspieszenie transkrypcji i translacji. Zapobiega katabolizmowi przez zmniejszenie aktywności lizosomów.

Ryc. 2 Schemat kaskady sygnału insuliny . RI – receptor insuliny, PKC – kinaza białkowa C, PI3-K – 3-kinaza fosfatidyloinozytolu, PDK – kinaza zależna od fosfatidyloinozytolu, PKB – kinaza białkowa B.



3.2.2.2 Rola PPAR γ w regulacji insulinowrażliwości

PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors* – receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów) są rodziną receptorów jądrowych, aktywowanych przez naturalnie występujące kwasy tłuszczowe i ich pochodne. Występują jako heterodimery z receptorami retinoidu X (*retinoid X receptors* – RXR). W odpowiedzi na przyłączenie ligandu łączą się ze specyficznymi sekwencjami DNA (PPRE – *PPAR response elements*), modyfikując ekspresję genów. PPAR α i PPAR γ są związane z metabolizmem tkanki tłuszczowej, a PPAR γ w szczególności z adipogenezą i wrażliwością tkanek na insulinę.

Gen tego receptora położony jest na chromosomie 3 (3p25). Składa się z 9 egzonów. Opisano trzy izoformy mRNA, różniące się na końcu 5': PPAR γ 1, PPAR γ 2 i PPAR γ 3, powstające wskutek różnego początku transkrypcji i odmiennego składania (*splicing*) RNA. Na matrycy RNA PPAR γ 1 i 3 powstaje to samo białko, PPAR γ 1, na matrycy RNA PPAR γ 2 – białko o tej samej nazwie, zawierające u człowieka 28 dodatkowych aminokwasów.

Białko PPAR γ składa się z kilku domen. NH₂ – końcowa domena A/B odpowiada za niezależną od ligandu aktywność transkrypcyjną, domena C, zawierająca palce cynkowe – za wiązanie DNA, region zawiasowy D – za przyłączanie kofaktorów. Część COOH – końcowa EF zawiera między innymi domeny: wiążącą ligand oraz domenę aktywacji zależnej od ligandu. Domena wiążąca ligand ma charakterystyczną budowę – stanowi, jak w innych receptorach jądrowych, „kieszę”, jednak o większej, niż w innych, objętości (1300Å³, w porównaniu do 600Å³). Ma to prawdopodobnie wpływ na funkcję tej części białka, potencjalnie przyłączającego wiele ligandów.

Nie odkryto dotychczas specyficznego ligandu PPAR γ o szczególnie dużym powinowactwie do receptora i potencjalnie dużym znaczeniu biologicznym. 15-deoksy- Δ 12,14-prostaglandyna J₂ spełnia wprawdzie pierwszy warunek, ale jej stężenia podczas adipogenezy i w innych stanach nasilenia funkcji PPAR γ są bardzo niewielkie. Na podstawie opisanych powyżej szczegółów budowy domeny wiążącej ligand oraz stwierdzenia, iż liczne cząsteczki (nienasycone kwasy tłuszczowe, utlenione pochodne lipidów, eikozanoidy) mogą wiązać się z tym receptorem sugeruje się, iż stanowi on „czujnik” metabolizmu kwasów tłuszczowych, odpowiadający za metaboliczne reakcje na zmiany w przyjmowaniu pokarmów.

Niewiele wiadomo o ekspresji PPAR γ w okresie rozwoju, lecz u dorosłych ssaków jest ona ograniczona. Najwięcej mRNA i białka wykrywane jest w tkance tłuszczowej, jelicie grubym i układzie krwiotwórczym. We wszystkich badanych tkankach formą dominującą jest PPAR γ 1,

jedynie w tkance tłuszczowej PPAR γ 2 występuje w znaczącej ilości, stanowiąc 20% RNA PPAR γ . Występowanie PPAR γ 3 jest ograniczone do makrofagów i jelita grubego.

Ekspresja genu tych receptorów regulowana jest przez wiele czynników metabolicznych i hormonalnych. U ludzi nie wpływają na nią krótkoterminowe zmiany w przyjmowaniu pokarmów, natomiast na gryzoniach wykazano jej zmniejszenie pod wpływem długotrwałego karmienia niskokalorycznym pożywieniem i cukrzycy zależnej od insuliny, a zwiększenie u zwierząt na diecie bogatotłuszczowej. Ciekawe jest, że u osobników o prawidłowej masie ciała większa jest ekspresja PPAR γ w podskórnej tkance tłuszczowej, podczas gdy u otyłych istotnie większa w tkance trzewnej. Ekspresja PPAR γ w mięśniach jest znacznie mniejsza (ok. 10% ekspresji w tkance tłuszczowej), była jednak intensywnie badana ze względu na potencjalny wpływ na wychwyt glukozy przez mioocyty pod wpływem insuliny. Nie jest ona w tej tkance, w przeciwieństwie do tłuszczowej, zależna od insuliny, zwiększa się pod wpływem leczenia agonistami PPAR γ , co sugeruje pewien stopień zmiany różnicowania komórek. PPAR γ zwiększa wychwyt glukozy przez komórki mięśni szkieletowych za pośrednictwem 3 – kinazy fosfatydyloinozytolu oraz przez translokację transportera GLUT-4, nie ma jednak pewności co do fizjologicznego znaczenia tego zjawiska .

Heterodimer PPAR γ /RXR bierze udział w dojrzewaniu adipocytów wspólnie z innymi grupami czynników transkrypcyjnych: białkami wiążącymi się z sekwencją wzmacniającą CCAATT (*CCAATT enhancer binding proteins*) – C/EBP, czynnikiem determinacji i różnicowania adipocytów/białkiem wiążącym się ze sterolowymi elementami regulatorowymi (*adipocyte determination and differentiation factor/sterol regulatory element-binding factor*) ADD1/SREBP1. Rolę odgrywa również zmniejszenie ekspresji genu RAR i zwiększenie ekspresji PPAR γ . Oba rodzaje receptorów tworzą heterodimery z RXR, przy czym w pierwszym RXR hamuje ekspresję genów odpowiedzialnych za adipogenezę, w drugim zaś nasila ją, wiążąc różne zestawy kofaktorów.

O udziale PPAR γ w adipogenezie może świadczyć odkrycie PPRE w promotorach genów biorących w niej udział białek: białka aP2, karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej, białka transportującego kwasy tłuszczowe-1 (*fatty acid transport protein-1*, FATP-1), lipazy lipoproteinowej.

PPAR γ działa w pętli sprzężenia zwrotnego z leptyną i czynnikiem martwicy guza α (*tumor necrosis factor α* , TNF α). Hamuje syntezę pierwszej z tych cytokin, sam podlegając hamowaniu przez drugą . Jednocześnie aktywacja PPAR γ powoduje hamowanie wydzielania TNF α . W otyłości stwierdza się zwiększone stężenie krążącego TNF α – być może stanowi to mechanizm zapobiegający dalszemu przyrostowi tkanki tłuszczowej. Podawanie agonistów PPAR γ otyłym

zwierzętom powodowało zmniejszenie ekspresji TNF α w tkance tłuszczowej, sprzyjając dalszemu wzrostowi masy ciała . Zatem aktywacja PPAR γ nie tylko doprowadza do różnicowania komórek w kierunku adipocytów, lecz także wpływa na utrzymanie ich fenotypu przez wywoływanie potrzebnej do tego odpowiedzi endokrynnej, autokrynnej i parakrynnej, obejmującej zmniejszenie wydzielania leptyny i TNF α oraz sprzyja gromadzeniu tłuszczu w tkance tłuszczowej . Ta właściwość stała się podstawą hipotezy, według której PPAR γ powodują „podkradanie” wolnych kwasów tłuszczowych i ich odkładanie (po zestryfikowaniu) w tkance podskórnej, w ten sposób zmniejszając ich szkodliwy wpływ na tkanki wrażliwe na insulinę, przede wszystkim mięśnie szkieletowe.

PPAR γ nie tylko bierze udział w różnicowaniu i dojrzewaniu adipocytów, lecz także w ich apoptozie . Jego aktywacja wywiera działanie proapoptotyczne głównie na komórki w pełni dojrzałe. Biorąc pod uwagę opisany wyżej udział receptora w dojrzewaniu preadipocytów, sumarycznym efektem jego aktywacji jest przebudowa tkanki tłuszczowej, polegająca na zastępowaniu adipocytów dojrzałych przez młode, co prowadzi do zmniejszenia wydzielania TNF α i wolnych kwasów tłuszczowych i może być istotnym mechanizmem zmniejszania insulinooporności.

3.3 Podstawy patogenezy cukrzycy typu 2

U podłoża cukrzycy typu 2 leży zarówno defekt wydzielania, jak i obwodowego działania insuliny (insulinooporność). Poniżej przedstawione zostaną szerzej patomechanizmy obu zjawisk.

3.3.1 Defekt wydzielania insuliny

3.3.1.1 Mechanizmy kompensacji insulinooporności i wyczerpania komórek β trzustki

Zaburzenia wydzielania insuliny wydają się być warunkiem koniecznym dla wystąpienia cukrzycy typu 2. U podłoża choroby leży niezdolność komórek β do wzmożonej produkcji i egzocytozy tego hormonu przy istniejącej insulinooporności (vide rozdział 3.3.2 „Insulinooporność”). U osób otyłych i otrzymujących przewlekłe diety o nadmiernej wartości energetycznej dochodzi do zwiększonej syntezy i wydzielania insuliny, co kompensuje oporność na insulinę. Stan taki może utrzymywać się przewlekłe lub prowadzić do wyczerpania komórek β . Zależy to czynników

genetycznych oraz działających w życiu płodowym i wcześnie po urodzeniu, które determinują rozwinięcie „wrażliwości” lub „oporności” komórek β na niekorzystne czynniki związane z wyżej wymienionymi warunkami. Jak wynika z badań na gryzoniach, kompensacja insulinooporności obejmuje zarówno zwiększenie masy komórek β , jak i nasilenie ich czynności. Stymulujący wpływ na wzrost masy komórek β może wywierać zwiększone stężenie we krwi substancji odżywczych: glukozy i wolnych kwasów tłuszczowych, insuliny i innych czynników wzrostu oraz zwiększona produkcja inkretyn i wrażliwość na nie. Udowodniono rolę glukozy i wolnych kwasów tłuszczowych oraz GLP1. Co ciekawe, w drugim z cytowanych badań (wykonanym na psach) stwierdzono, iż hiperinsulinemia pojawia się u osobników otrzymujących dietę wysokotłuszczową mimo braku hiperglikemii, a przy zwiększonym stężeniu we krwi GLP1 i wolnych kwasów tłuszczowych.

Mechanizmy komórkowe, w jakich dochodzi do długoterminowego zwiększenia biosyntezy insuliny, nie są jasne. Należą do nich: zwiększony metabolizm glukozy, akumulacja malonylo-CoA i estrów koenzymu A oraz długocząściowych kwasów tłuszczowych w cytozolu, prowadząca przez hamowanie utleniania kwasów tłuszczowych do zwiększenia stężenia diacyloglicerolu, pobudzającego wydzielanie insuliny, jak to opisano powyżej (vide rozdział 3.2.1. „Fizjologia wydzielania insuliny”) oraz nasilenie ekspresji genu insuliny.

Jak już wspomniano, kompensacja insulinooporności może być trwała lub prowadzić do wyczerpania komórek β . Do wrodzonych czynników, decydujących o ich podatności na wyczerpanie, należą polimorfizmy genów i zróżnicowana ekspresja genów w „podatnych” i „opornych” komórkach. Przykładami genów kodujących białka, biorące udział w wydzielaniu insuliny, których polimorfizmy mają dobrze udokumentowany związek z cukrzycą typu 2, są: TCF7L2 i KCNJ11(Kir6.2). Pierwszy z nich koduje czynnik transkrypcyjny, działający prawdopodobnie przez regulację ekspresji genu proglukagonu (a przez to również syntezy GLP1); drugi - podjednostkę kanału potasowego, której funkcję opisano powyżej (vide rozdział 3.2.1. „Fizjologia wydzielania insuliny”).

Do genów o zmniejszonej ekspresji w komórkach β u chorych na cukrzycę typu 2 należy gen hepatocytowego czynnika jądrowego 4 α (HNF4 α), którego mutacja odpowiada również za cukrzycę MODY 1.

Na podatność komórek β na wyczerpanie wpływają także zaburzenia nabyte w życiu wewnątrzłonowym. Na mysim modelu wewnątrzmacicznego opóźnienia wzrostu wykazano zwiększenie podstawowego wydzielania insuliny i jednocześnie zahamowanie sekrecji hormonu w odpowiedzi na glukozę.

3.3.1.2 Zaburzenia efektu inkretynowego

U chorych na cukrzycę typu 2 efekt inkretynowy jest osłabiony lub zniesiony (wydzielanie insuliny po izoglikemicznym teście dożylnego i doustnego obciążenia glukozą jest niemal identyczne) , co może być jedną z przyczyn hiperglikemii poposiłkowej. Podanie egzogennych inkretyn powoduje u tych chorych poprawę pierwszej fazy wydzielania insuliny i normalizację drugiej fazy . Mimo iż doniesienia na temat wydzielania GIP w cukrzycy typu 2 nie są spójne, przeważająca ilość dowodów przemawia za tym, że sekrecja tego hormonu jest zachowana lub upośledzona jedynie w nieznacznym stopniu. Jednocześnie dochodzi do zmniejszenia wydzielania GLP1 . Z drugiej strony, w badaniu z zastosowaniem dożylnego wlewu obu hormonów ustalono, iż u chorych na cukrzycę typu 2 fizjologiczne działanie GIP jest znacznie osłabione, natomiast GLP1 – stosunkowo zachowane . Przypuszcza się, iż osłabienie efektu GIP może być spowodowane desensytyzacją lub wzmożoną internalizacją jego receptora, u części chorych być może również nieustalonym dotychczas genetycznym defektem białka receptorowego.

Zmniejszone wydzielanie GLP1 u chorych na cukrzycę typu 2 przy niemal zachowanym działaniu hormonu stwarza interesującą perspektywę terapeutyczną. Istotnie, w badaniu z wykorzystaniem metody klamry hiperglikemicznej, stwierdzono w tej grupie normalizację drugiej fazy wydzielania insuliny w odpowiedzi na glukozę pod wpływem dużych dawek egzogennej GLP1 . Wyniki szczegółowych prób z zastosowaniem różnych dawek tego hormonu u osób z cukrzycą typu 2 i zdrowych wskazują jednak na mniejszy wzrost wrażliwości komórek β na glukozę u chorych . Zatem osłabienie wpływu GLP1 na komórki β również może przyczyniać się do zmniejszenia efektu inkretynowego w tej chorobie. Ma jednak dużo mniejsze znaczenie niż w przypadku GIP.

3.3.2 Insulinooporność

3.3.2.1 Definicja insulinooporności, szkic patogenezy zjawiska

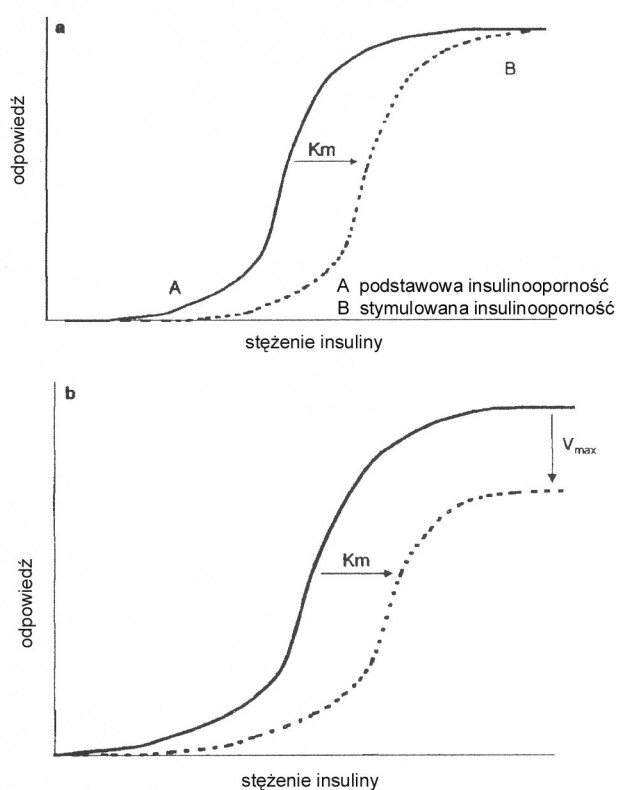
Kluczową rolę w patogenezie cukrzycy typu 2 odgrywa także insulinooporność, definiowana jako zmniejszona zdolność insuliny do działania na tkanki obwodowe, np. mięśnie szkieletowe, wątrobę, tkankę tłuszczową . Pojawia się ona jeszcze przed początkiem klinicznie jawnej cukrzycy, stanowiąc istotny mechanizm jej rozwoju. Na wystąpienie insulinooporności wpływają czynniki genetyczne i środowiskowe. Wśród tych ostatnich wymienia się przede wszystkim hiperalimentację i związaną z nią otyłość, starzenie oraz małą aktywność fizyczną. Istotna, choć

malejąca z wiekiem chorego jest rola czynników genetycznych . Genetyczne podstawy insulinooporności pozostają w dużej mierze nieznane. Doniesienia o mutacjach receptora insulinowego mają charakter kazuistyczny - wyjaśniają ułamek procenta wszystkich przypadków cukrzycy ze współlistniejącą insulinoopornością .

Insulinooporność jest stanem, w którym insulina w fizjologicznym stężeniu wywołuje efekt mniejszy od przewidywanego. Może to być spowodowane zaburzeniami przedreceptorowymi, receptorowymi lub pozareceptorowymi. Pierwsza grupa obejmuje stany, kiedy insulina jest unieczynniana lub rozkładana przed związaniem z receptorem. Najlepiej poznana jest insulinooporność immunologiczna, spowodowana inaktywacją hormonu przez przeciwciała z grupy IgG. Dotyczy chorych otrzymujących insulinę egzogenną. Zaburzenia receptorowe polegają na zmniejszeniu ilości receptorów insuliny lub ich powinowactwa do hormonu. Jako że do uzyskania maksymalnego efektu komórkowego wystarczy zwiążenie 20% receptorów na powierzchni komórki β , powodują one zmniejszenie biologicznego działania insuliny tylko przy jej stężeniu niewyzwalającym maksymalnego efektu komórkowego. Wzrost stężenia insuliny w przestrzeni pozakomórkowej może doprowadzić do pełnego działania biologicznego w komórce. Stan taki nazywamy zmniejszoną wrażliwością na insulinę (*decreased insulin sensitivity*)

Insulinooporność pozareceptorowa jest skutkiem zmian w sprzężeniu sygnału z kompleksu insulina – receptor z układem efektorowym komórki. Powodują one zmniejszenie działania biologicznego insuliny w każdym stężeniu, także w tym, które powinno wywołać maksymalną odpowiedź. Taki stan zwany jest zmniejszoną reaktywnością na insulinę (*decreased insulin responsiveness*) (vide rycina 3).

Ryc.3 Krzywe przedstawiające zależność między dawką a efektem działania insuliny - odpowiedź jest sigmoidalną funkcją dawki insuliny. Linia ciągła przedstawia normalną insulino-wrażliwość, przerywana odpowiada stanom oporności na insulinę. (a) przesunięcie krzywej na prawo – wzrost stałej Michaelisa (K_m) – sytuacja odpowiadająca zmniejszeniu wrażliwości w zaburzeniach receptorowych. (b) dodatkowo obniżenie V_{max} – zaburzenia pozareceptorowe, zmniejszenie reaktywności



Do hipotetycznych mechanizmów insulinooporności pozareceptorowej zalicza się: zaburzenie funkcji kinazy tyrozynowej podjednostki β receptora insulinowego, zmianę struktury i funkcji białkowych przekaźników działania insuliny, zmniejszenie liczby i aktywności przenośników glukozy GLUT-4, zmniejszenie aktywności syntazy glikogenu, kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej i dezaminazy adenozyliny oraz zwiększone wytwarzanie amyliny, zmiany w tkance mięśniowej (zwiększenie proporcji szybko kurczących się, mniej wrażliwych na insulinę, włókien białych do czerwonych, zmniejszenie gęstości naczyń włosowatych) i tłuszczowej (otyłość brzuszna). W badaniach ekspresji genów w ludzkich komórkach β z wykorzystaniem techniki mikromacierzy udowodniono zmniejszenie ekspresji genów kodujących

czynniki należące do łańcucha przekazywania sygnału insuliny (receptora insulinowego, IRS-2 i Akt2 [kodujący jedną z kinaz serynowo – treoninowych]) u chorych na cukrzycę typu 2 . Wykazano również zmniejszenie ekspresji białek łańcucha oddechowego, regulowanych przez jądrowy czynnik oddechowy (*nuclear respiratory factor* – NRF) i jego koaktywator, PGC1 α , w mięśniach szkieletowych .

Otyłość brzuszna wywołuje z jednej strony zwiększenie wydzielania hormonów tkanki tłuszczowej (leptyna, rezystyna) oraz cytokin wywołujących insulinooporność, z drugiej wzmożone uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych do krwi krążącej.

3.3.2.2 Rola wolnych kwasów tłuszczowych w powstawaniu insulinooporności

Według klasycznej koncepcji Randle'a i wsp. utlenianie wolnych kwasów tłuszczowych (*free fatty acids* – FFA) w komórkach mięśni hamuje glikolizę i dalsze przemiany pirogronianu przez zwiększenie stosunku $\text{NADH}^+ + \text{H}^+ / \text{NAD}^+$ i acetylo-CoA/CoA, co doprowadza do inaktywacji dehydrogenazy pirogronianowej. Powstający acetylo-CoA powoduje ponadto wzmożone wytwarzanie cytrynianu, silnego inhibitora fosfofruktokinazy. Hamowanie tego enzymu doprowadza do nagromadzenia glukozy-6-fosforanu i zahamowania heksokinazy II i, co za tym idzie, wychwyty glukozy.

Późniejsze badania wykazały, iż wolne kwasy tłuszczowe powodują zahamowanie wychwyty glukozy również przez bezpośrednie upośledzenie jej transportu i fosforylacji. Ten mechanizm ma większe znaczenie i odpowiada za powodowane przez FFA zmniejszenie wychwyty glukozy w dwóch trzecich (pozostała jedna trzecia efektu spowodowana jest hamowaniem metabolizmu tlenowego glukozy) . Upośledzenie transportu i fosforylacji glukozy wynika z zakłócania przez metabolity przemiany tłuszczów przekazywania sygnału z receptora insuliny. W szczególności, diacyloglicerol i acylo-CoA oraz ceramidy aktywują kaskadę kinaz serynowo/treoninowych przez kinazę białkową C θ , doprowadzając do fosforylacji reszt serynowych i treoninowych substratu receptora insuliny-1 (IRS-1), zmniejszając możliwość jego aktywacji .

Oporność na insulinę komórek wątroby jest przyczyną hiperglikemii na czczo, jako że endogenna produkcja glukozy (80% w wątrobie, 20% w nerkach) jest w tym stanie jedynym jej źródłem. Insulina hamuje silniej glikogenezę wątrobową niż glukoneogenezę. Wolne kwasy tłuszczowe osłabiają supresyjne działanie hormonu głównie na ten pierwszy proces. Mechanizmy tego zjawiska nie zostały poznane. Ponieważ u szczurów indukowana przez wolne

kwasy tłuszczowe insulinooporność wiąże się z aktywacją kinazy białkowej C δ , postuluje się mechanizm podobny jak w komórkach mięśniowych – osłabianie przekazywania sygnału z receptora insuliny. Wysuwane są również inne hipotezy, dotyczące wpływu FFA na powstawanie insulinooporności w cukrzycy typu 2. Dotyczą jednak głównie glukoneogenezy. Zwiększenie stężenia FFA w osoczu powoduje nasilenie ich wychwytu przez hepatocyty, utleniania i gromadzenia acetylo-CoA. To stymuluje karboksylazę pirogronianową i karboksykinazę fosfoenolpirogronianową, enzymy regulujące glukoneogenezę, oraz glukozo-6-fosfatazę, co powoduje zwiększone uwalnianie glukozy z hepatocytów. Nasilone utlenianie kwasów tłuszczowych staje się źródłem energii dla endoenergetycznego procesu glukoneogenezy. Wolne kwasy tłuszczowe stymulują glukoneogenezę w sposób zależny od stężenia. Acetylokoenzym A nasila glukoneogenezę przez aktywację karboksylazy pirogronianowej.

3.4 Zarys genetyki cukrzycy typu 2

3.4.1 Przegląd wyników dotychczasowych badań genetycznego podłoża cukrzycy typu 2

Jak wspomniano, oprócz silnego wpływu środowiska (w tym głównie niewłaściwej diety oraz braku wysiłku fizycznego) o rozwoju cukrzycy typu 2 decydują czynniki genetyczne. Ich identyfikacja ma nie tylko znaczenie naukowe, może znacząco wpłynąć na zapobieganie i leczenie choroby. Znalazła też odzwierciedlenie w obecnej klasyfikacji cukrzycy. Jak dotąd, największe postępy poczyniono w badaniach nad genetycznym podłożem form monogenowych choroby. Udało się zidentyfikować m. in. sześć genów, których mutacje, dziedziczące się w sposób autosomalny dominujący i charakteryzujące się dużą penetracją fenotypową, powodują powstawanie cukrzycy MODY (*maturity-onset diabetes of the young* – cukrzyca typu dorosłych u młodych). Kodują one czynniki transkrypcyjne (HNF4 α , którego mutacja odpowiada za MODY1, HNF1 α odpowiadający za MODY3, IPF – MODY4, HNF1 β – MODY5, NEUROD1 – MODY6), oraz enzym – glukokinazę – MODY2 (funkcję białka jako „czujnika” glukozy komórki β omówiono w rozdziale 3.2.1. „Fizjologia wydzielania insuliny”). Te monogenowe formy są jednak rzadkie, stanowiąc do 5% przypadków cukrzycy typu 2, w większości przypadków dotyczą genów związanych z regulacją wydzielania insuliny. Do cukrzycy mogą prowadzić także rzadkie, dziedziczone jednogenowo zespoły insulinooporności oraz zaburzenia dotyczące DNA mitochondrialnego (dziedziczona w sposób matczynej cukrzyca i

głuchota – *maternally inherited diabetes with deafness* – MIDD, część przypadków zespołu Wolframa). Genetycznie uwarunkowane zespoły insulinooporności zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Genetycznie uwarunkowane zespoły insulinooporności (według , zmienione).

<i>Choroba</i>	<i>OMIM</i>	<i>Dziedziczenie</i>	<i>Gen</i>	<i>Białko</i>
Mutacje receptora insuliny				
Krasnoludkowatość (leprechaunizm)	246200	AD	INSR	Receptor insuliny
Zespół Rabsona – Mendenhalla	262190	AR	INSR	Receptor insuliny
Insulinooporność typu A	147670	AR/AD	INSR	Receptor insuliny
Lipodystrofie				
Wrodzona uogólniona lipodystrofia Berardinellogo i Seipa	269700	AR	BSCL2 AGPAT2	Seipina Acetylotransferaza 1-acyloglicerolo-3- fosforanowa Laminy: A i C
Rodzinna częściowa lipodystrofia typu Dunningana	151660	AD	LMNA	Laminy: A i C
Lipodystrofia z dysplazją żuchwy i kończyn	248370	AR	LMNA	Laminy: A i C
Lipoatrofia z cukrzycą, stłuszczeniem wątroby, kardiomiopatią przerostową i grudkami leukomelanodermicznymi	608056	AD	LMNA	Laminy: A i C
Lipodystrofia częściowa rodzinna typu 3 (FPLD3)	604367	AD	PPAR γ	PPAR γ
Inne zespoły				
Ciężka insulinooporność, rogowacenie ciemne i dyslipidemia z lub bez cukrzycy		Dwugenowe	PPAR γ i PPP1R3A	PPAR γ i podjednostka regulacyjna fosfatazy białkowej-1
Pseudoakromegalia z ciężką insulinoopornością	602511	Nieznane	Nieznany	Nieznane
Zespół Alstroma	203800	AR	ALMS1	KIAA0328
Zespół Wernera	277700	AR	RECQL2	Białko podobne do helikazy DNA
Zespół wielotorbielowatych jajników	184700	AD/oligog.	CYP11A	CYP11A

Warto zwrócić tu uwagę na udział mutacji jednego z genów badanych w niniejszej pracy, PPAR γ , w powstawaniu zespołów insulinooporności. W ramach badań, mających na celu wykrycie podłoża genetycznego ciężkiej insulinooporności wykryto u członków dwóch rodzin mutacje genu tego receptora: Val290Met i Pro467Leu . Osoby dotknięte zespołem zostały zidentyfikowane jako heterozygoty pod względem mutacji, które powodują zmianę orientacji helisy 12 białka, odpowiedzialnej za wiązanie ligandu i przyłączanie koaktywatorów. Pociąga to za sobą zmniejszenie aktywności transkrypcyjnej PPAR γ . Mutacje mają charakter dominujący, co według autorów oryginalnej publikacji wynika z hamowania transkrypcji zdrowej kopii genu.

Początkowo nie stwierdzono u chorych lipodystrofii, dalsze badania wykazały jednak u nich zmniejszenie ilości podskórnej tkanki tłuszczowej kończyn i pośladków . Mutację PPAR γ wykazano również u pięciorga członków jednej rodziny z ciężką insulinoopornością, różnego stopnia rogowaceniem ciemnym, dyslipidemią, nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą. Te cechy są elementami dziedzicznego dwugenowo zespołu, spowodowanego mutacjami w genach PPAR γ i PPP1R3A (*protein phosphatase 1 regulatory subunit 3A* – podjednostki regulatorowej 3A fosfatazy białkowej 1) . Ekspresja drugiego z wymienionych genów zachodzi głównie w mięśniach. Chorują złożone heterozygoty. Mutacja PPAR γ prowadzi do powstania białka o skróconej domenie wiążącej ligand, natomiast mutacja PPP1R3A – do nieprawidłowego rozmieszczenia białka wewnątrz komórek. Interesujące jest, że o ile każda z nich pojedynczo powoduje jedynie niewielkie nieprawidłowości metabolizmu ich współlistnienie wywołuje ciężką insulinooporność. Postęp w poznawaniu genetycznego podłoża najczęściej występujących, złożonych form cukrzycy typu 2 jest wolniejszy. Składa się na to wiele przyczyn: wspomniany już silny wpływ czynników środowiskowych na wystąpienie choroby (ich rola rośnie z czasem życia), różny, często późny, czas jej ujawnienia się (osoby uznane za zdrowe w badaniu przekrojowym mogą w ciągu dalszego życia zachorować) , dziedziczenie wielogenowe - o rozwoju choroby decydują polimorfizmy wielu genów, z których każdy ma niewielki, trudny do wykrycia, efekt; heterogenność genetyczna (fenotyp cukrzycy typu 2 może być wynikiem różnych konstelacji polimorfizmów i mutacji genetycznych). Stwarza to konieczność badania dużych populacji w celu wykrycia słabych zależności. Populacje te powinny być homogenne genetycznie, co pozwala na uniknięcie tzw. stratyfikacji populacyjnej, wynikającej z niejednorodności genetycznej badanych grup (np. osoby rasy kaukaskiej w USA mające przodków w różnych narodowościach europejskich). Jak wykazali autorzy amerykańscy, populacja polska należy do stosunkowo jednolitych pod względem genetycznym .

Wynikającym z powyższych przyczyn istotnym problemem dotyczącym zarówno badań sprzężeń (*linkage*) jak i związku (*association*) poszczególnych genów z chorobą jest często obserwowany brak powtarzalności wyników w różnych, a nawet tych samych populacjach .

W tabeli 2 zebrano wyniki badań związku polimorfizmów genów – kandydatów z cukrzycą typu 2.

Tabela 2. Zestawienie badań związku wybranych genów – kandydatów z cukrzycą typu 2 (według , zmienione; piśmiennictwo podano jedynie odnośnie do badań niewymienionych w cytowanej publikacji)

<i>Gen</i>	<i>Polimorfizmy</i>	<i>Populacje, których badania potwierdziły związek z cukrzycą t.2</i>	<i>Populacje, których badania nie potwierdziły związku z cukrzycą t.2</i>
ABCC8 (SUR1)	C/T (egzon 22) Ser 1370Ala i inne	Duńska; fińska; brytyjska; północnoeuropejska; skandynawska; japońska; polska (z otyłością rodzinną)	Duńska; japońska
ADRB3 (receptor β3- adrenergiczny)	Trp64Arg	Japońska; polska (z otyłością rodzinną)	Skandynawska; fińska; japońska,
ADRB2 (receptor β2- adrenergiczny)	Gln27Glu	Japońska	Skandynawska
APM1 (adiponektyna)	SNP45 i SNP 476	Japońska; francuska	
CAPN10 (kalpaina 10)	SNP41, SNP43, efekty haplotypów i inne polimorfizmy	Amerykanie pochodzenia meksykańskiego; Afroamerykanie; japońska; polska; metaanaliza	Samoańska; japońska; Pima; Oji-Cree, brytyjska; metaanaliza

Tabela 2 – ciąg dalszy

FABP2 (białko wiążące kwasy tłuszczowe-2)	Ala54Thr	Pima; meksykańska	brytyjska; Skandynawska; Afroamerykanie
GC (białko wiążące witaminę D)	Asp416Glu, Thr420Lys	Japońska	Amerykanie pochodzenia kaukaskiego; francuska; polska
GCGR(receptor glukagonu)	Gly40Ser	Francuska; mieszkańców Sardynii	Japońska; fińska; mieszkańców Sardynii; rosyjska
GYS1 (syntaza glikogenu)	Met416Val	Fińska; francuska; Pima	Japońska; fińska; skandynawska
HNF4A (czynnik jądrowy hepatocytów 4α)	Thr130Ile, Val255Met; SNP w obrębie promotora; haplotypy	Japońska; brytyjska; fińska; Żydów aszkenazyjskich	Duńska; szwedzka; fińska; polska
IAPP (amylina)	Ser20Gly	Japońska	Skandynawska
IGF1 (insulinopodobny czynnik wzrostu-1)	Mikrosatelita 1kb 5' od startu transkrypcji IGF1	Holenderska	Brytyjska
INS (insulina)	-23A/T; VNTR	Brytyjska	Skandynawska
INSR (receptor insuliny)	Val985Met i inne polimorfizmy	Holenderska; brytyjska	Walijska; duńska
IRS1 (substrat receptora insuliny-1)	Gly972Arg; Ala512Pro	Holenderska; metaanaliza	Skandynawska
IRS2 (substrat receptora insuliny-2)	Gly1057Asp	Włoska (z nadwagą); Pima	Fińska; chińska; włoska

Rola wybranych polimorfizmów w białkach receptorowych w patogenezie cukrzycy typu 2, przedcukrzycowych cech ilościowych i otyłości w populacji polskiej

<i>Gen</i>	<i>Polimorfizmy</i>	<i>Populacje, których badania potwierdziły związek z cukrzycą t.2</i>	<i>Populacje, których badania nie potwierdziły związku z cukrzycą t.2</i>
KCNJ11 (KIR6.2)	Glu23Lys	Francuska; brytyjska; duńska	Skandynawska
NOS3 (śródblonkowa syntaza tlenu azotu)	(-)786T-C; IVS18+27C	D298, Japońska, włoska	

Tabela 2. – ciąg dalszy

kinazy fosfatydyloinozytolu PON2 (paraoksonaza 2)	Ala148Gly	Oji-Cree	Skandynawska; kanadyjska
PPAR γ (receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomów γ)	Pro12Ala	Skandynawska; kanadyjska; Amerykanie pochodzenia japońskiego; metaanaliza	Brytyjska; francuska; włoska
PGC1 (koaktywator 1 receptora aktywowany przez proliferatory peroksyosomów γ)	Gly482Ser i inne SNP	Duńska; japońska	Francuska; Pima
PPP1R3A (regulatorowa podjednostka 3A fosfatazy białkowej 1)	Asp90Lys, 3'UTR in/del i fs/stop	Pima; duńska;	Oji-Cree; szwedzka; japońska
RRAD (związany z ras gen związany z cukrzycą)	Powtórzenia trzynukleotydowe	Amerykanie pochodzenia kaukaskiego	
SLC2A2 (transporter glukozy GLUT2)	Thr110Ile i inne polimorfizmy	Brytyjska	Pima; zachodnioindyjska; duńska, włoska;
TNF (czynnik martwicy guza)	-238A/G	Północnoeuropejska	Skandynawska;
UCP2 (białko rozprzęgające 2)	-866G/A i A55V	Francuska	kanadyjska Duńska; japońska
UCP3 (białko rozprzęgające 3)	-55 C/T	Francuska; chińska	

3.4.2 Polimorfizm Pro12Ala genu PPAR γ a cukrzyca typu 2 i przedcukrzycowe cechy ilościowe

Poza wymienionymi wyżej rzadkimi mutacjami prowadzącymi do zespołów insulinooporności opisano w sekwencji kodującej genu PPAR γ częstszy polimorfizm CCA → GCA w kodonie 12(rs1805192), skutkujący substytucją proliny przez alaninę. Dotyczy on

egzonu B, kodującego NH-końcową domenę białka, specyficzną dla izoformy PPAR γ 2. Jest stosunkowo częsty u osób rasy kaukaskiej (częstość występowania allelu Ala - 12%), rzadszy u Indian amerykańskich (10%), Samończyków (8%), Japończyków (3%), Chińczyków (1%) . W wielu populacjach opisano jego związek z cukrzycą typu 2. Pierwsze tego typu doniesienie dotyczyło populacji Amerykanów pochodzenia japońskiego i było oparte na badaniu kliniczno – kontrolnym (*case-control study*) . Obecność allelu z alaniną w pozycji 12 łączyła się z mniejszą aktywnością receptora, mniejszym wskaźnikiem masy ciała i większą insulinowrażliwością. W większości kolejnych badań w różnych populacjach nie udało się jednak powtórzyć znamienego wyniku . Potwierdzenie roli polimorfizmu w patogenezie cukrzycy uzyskali autorzy pracy obejmującej badanie rodzin (z wykorzystaniem testu nierównowagi transmisji – *transmission-disequilibrium test*) i osób niespokrewnionych (badanie kliniczno – kontrolne [*case – control study*]) z populacji skandynawskiej oraz metaanalizę połączonych danych z wcześniejszych publikacji . Był to jedyny z 16 badanych wariantów genetycznych, którego związek z cukrzycą udało się potwierdzić. Jak obliczyli autorzy badania, mimo niewielkiego wpływu na ryzyko wystąpienia cukrzycy u pojedynczej osoby – iloraz ryzyka (*risk ratio*) zachorowania na cukrzycę typu 2 u nosicieli allelu Ala od 0,71 do 0,88 w różnych podpunktach badania – ze względu na duże rozpowszechnienie allelu Pro, związanego z większym ryzykiem, populacyjny wskaźnik ryzyka (*population-attributable risk*) wynosi 25%. Oznacza to, iż gdyby w populacji istniał tylko allel Ala, zachorowalność na cukrzycę typu 2 byłaby o 25% mniejsza. Związek polimorfizmu z chorobą (tzn. ochronne działanie rzadszego allelu – Ala) został potwierdzony w dalszych badaniach . Z drugiej strony, istnieją doniesienia sugerujące jego brak lub wręcz większe ryzyko zachorowania w pewnych grupach .

Parametry opisujące ilościowo zaburzenia wydzielania insuliny przez komórki β wysp trzustkowych i zmiany insulinowrażliwości, zwane w literaturze przedcukrzycowymi cechami ilościowymi (*prediabetic quantitative traits, prediabetic phenotypes*) oraz otyłość również były badane pod kątem związku z polimorfizmem Pro12Ala genu PPAR γ . W oryginalnej publikacji obecność allelu Ala wiązała się z mniejszym wskaźnikiem masy ciała i większą wrażliwością na insulinę. Po uwzględnieniu tego pierwszego czynnika w analizie statystycznej nie stwierdzano różnic w insulinooporności między homozygotami Pro/Pro i nosicielami allelu Ala . Nieznany pozostał zatem pierwotny mechanizm, w którym polimorfizm PPAR γ Pro12Ala wpływa na zmniejszenie ryzyka zachorowania na cukrzycę – przez wpływ na metabolizm tłuszczów czy węglowodanów? Kolejne badania w większości potwierdzały większą insulinowrażliwość nosicieli allelu Ala. W populacji niemieckiej wynik taki uzyskano porównując metodą euglikemicznej

hiperinsulinemicznej klamry metabolicznej (stanowiącej „złoty standard” w badaniach insulinooporności) wychwyty glukozy u heterozygot Pro/Ala i homozygot Pro/Pro, dobranych pod względem płci, wskaźnika masy ciała, ilości i rozmieszczenia tkanki tłuszczowej. Badanie tą samą metodą dało podobny rezultat u siedemdziesięcioletnich mężczyzn ze Szwecji z prawidłową tolerancją glukozy. Nie stwierdzono w nim jednak znamiennej statystycznie różnicy insulinowrażliwości między genotypami dla badanej grupy Duńczyków. W badaniu rodzeństw z populacji chińskiej i japońskiej, wrażliwość na insulinę określana metodą HOMA (*homeostasis model assessment*) również była większa u nosicieli allelu Ala, podobnie u hiszpańskich kobiet i Amerykanów rasy kaukaskiej (stwierdzono tu znamiennej ujemną korelację między ilością allelu Ala a stężeniem insuliny na czczo i HOMA-IR) i pochodzenia afrykańskiego bez otyłości. W populacji duńskiej stwierdzono rzadsze występowanie zespołu insulinooporności u homozygot Ala/Ala. Wpływ polimorfizmu wydaje się być silniejszy u otyłych. Istnieją jednak również doniesienia o mniejszej wrażliwości na insulinę nosicieli zmutowanego allelu.

Nie ma dowodów na bezpośredni wpływ polimorfizmu Pro12Ala na wydzielanie insuliny, jednak badanie funkcji komórki β metodą HOMA u Japończyków chorych na cukrzycę typu 2 wskazuje na jego zmniejszenie u nosicieli allelu Ala. Wlew lipidów, powodujący czterokrotne zwiększenie stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy, powodował w czasie badania metodą klamry hiperglikemicznej zmniejszenie wydzielania insuliny u nosicieli allelu Ala i jego zwiększenie u homozygot Pro/Pro. Również w badaniu kohortowym, oceniającym w populacji fińskiej występowanie cukrzycy typu 2 u osób z nietolerancją glukozy w ciągu trzech lat obserwacji (*Finnish Diabetes Prevention Study*), stwierdzono częstsze zachorowania w grupie nosicieli allelu Ala. Oni też byli bardziej wrażliwi na intensywną interwencję obejmującą dietę i wysiłek fizyczny, mającą zapobiec wystąpieniu cukrzycy. Autorzy tłumaczą otrzymane wyniki dwukierunkowymi skutkami polimorfizmu: zmniejszeniem wydzielania insuliny przy jednoczesnej większej insulinowrażliwości. Jednak badanie wykonane u osób z nietolerancją glukozy (*STOP-NIDDM Trial*), testujące skuteczność akarbozy w zapobieganiu przejściu tego stanu przedcukrzycowego w cukrzycę typu 2, wykazało wcześniejszą progresję wśród otrzymujących lek kobiet o genotypie Pro/Pro.

Również odnośnie do związku polimorfizmu Pro12Ala z otyłością dane z dotychczasowych badań są sprzeczne. U Indian Pima stwierdzono sprzężenie ilości tkanki tłuszczowej z locus 3p24.2-p22, które znajduje się w pobliżu locus 3p25-p24.2 obejmującego gen PPAR γ (ze wskaźnikiem logarytmu z prawdopodobieństwa – *logarithm of odds* – LOD – score 2,0). Badania przekrojowe wskazują na brak związku lub na nieco większy BMI u nosicieli allelu

Ala . W dużych grupach, obejmujących po ponad 1000 osób bez cukrzycy, stwierdzono mniejszy wskaźnik masy ciała u nosicieli allelu Ala u Finów i brak związku u Japończyków . Metaanaliza danych opublikowanych do 2003r. (obejmująca dane 19136 osób, w tym grup badanych z obu ostatnich cytowanych prac) wskazuje jednak na większy BMI u nosicieli allelu Ala. Podobnie u osób z prawidłową tolerancją glukozy w badaniu wśród mieszkańców Singapuru . Badania kohortowe wykazują większy przyrost wagi u tych osób . Jego przyczynę może jednak stanowić sama większa insulinowrażliwość , a zwłaszcza zwiększone hamowanie przez insulinę lipolizy .

3.4.3 Potencjalna rola wariantów genetycznych receptora GLP1 (Gly168Ser i Phe260Leu) w patogenezie cukrzycy typu 2 i przedcukrzycowych cech ilościowych

GLP1R jest receptorem błonowym, białkiem składającym się z 463 aminokwasów, zawierającym 7 domen przezbłonowych, sprzężonym z cyklazą adenylową . Gen kodujący to białko jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 6 (6p21) . Polimorfizmy w nim mogą powodować zmiany w odpowiedzi na przyłączenie ligandu i być związane z patogenezą zaburzeń tolerancji glukozy. Mimo iż w populacji japońskiej nie stwierdzono związku polimorfizmów markerów mikrosatelitarnych, znajdujących się w pobliżu genu, z cukrzycą typu 2 , nie wyklucza to słabej zależności, co podkreślają sami autorzy publikacji, a tym bardziej istnienia związku z cukrzycą typu 2 polimorfizmów w samym genie w innych populacjach. W dotychczasowych badaniach nie stwierdzono sprzężenia locus genu GLP1R z cukrzycą typu 2 w rodzinach francuskich ani związku polimorfizmów w tym genie z ilorazem szans (*odds ratio* – OR) na progresję z nietolerancji glukozy do cukrzycy typu 2 w *Finnish Diabetes Prevention Study* . Niemniej jednak podjęto badania tego genu w niniejszej pracy z następujących powodów: badania sprzężeń mogą nie wykazać słabych zależności, jakich należy się spodziewać przy chorobach dziedziczonych wielogenowo (vide rozdział 3.4.1 „Przegląd wyników dotychczasowych badań genetycznego podłoża cukrzycy typu 2”), a różne warunki metaboliczne w stanach prawidłowej tolerancji i nietolerancji glukozy mogą różnie wpływać na rolę polimorfizmów w funkcjonowaniu białek .

3.4.4 Mutacja Pro115Gln a otyłość jako cecha przedcukrzycowa

W populacji niemieckiej opisano mutację genu PPAR γ , skutkującą substytucją proliny przez glutaminę w pozycji 115 łańcucha aminokwasowego, związaną ze znaczną otyłością . Jak

udowodnili autorzy publikacji, wiąże się ona z utrudnieniem fosforylacji seryny w pozycji 114 i zwiększoną aktywnością transkrypcyjną białka, prowadzącą do wzmożonego dojrzewania adipocytów. Mimo iż w oryginalnej publikacji występowała ona stosunkowo często (u 4 z 358 badanych, w tym 121 otyłych), w wielu kolejnych badaniach różnych populacji nie udało się jej wykryć .

4 ZAŁOŻENIA PRACY

Udowodniona rola czynników genetycznych w patogenezie cukrzycy typu 2 oraz przedcukrzycowych cech ilościowych, a zarazem rozbieżne wyniki badań konkretnych wariantów genów w różnych grupach etnicznych oraz grupach wydzielonych ze względu na status metaboliczny, jak też fakt, iż wiele polimorfizmów w genach – kandydatach, kodujących białka związane z metabolizmem glukozy, nie zostało jeszcze zbadanych pod kątem związku z tą chorobą, stanowią podstawy do poszukiwań, mających na celu tak weryfikację w kolejnych populacjach zależności już opublikowanych, jak i poszukiwanie nowych. Dodatkowym źródłem wiedzy o genetycznie uwarunkowanych zaburzeniach przemiany materii, prowadzących do wystąpienia cukrzycy typu 2, mogą być przypadki rzadkich mutacji genów związanych z homeostazą energetyczną.

Próba replikacji w ramach niniejszej pracy opisanej uprzednio zależności dotyczyła związku polimorfizmu Pro12Ala genu PPAR γ z cukrzycą typu 2 (vide rozdział 3.4.2. „Polimorfizm Pro12Ala genu PPAR γ a cukrzyca typu 2 i przedcukrzycowe cechy ilościowe”). Ponadto zbadano pod kątem związku z cukrzycą typu 2 dwa z polimorfizmów w genie receptora glukagonopodobnego peptydu 1: A \rightarrow C w egzonie 7, powodujący substytucję leucyny w miejsce fenyloalaniny w pozycji 260 łańcucha aminokwasowego (rs1042044) oraz G \rightarrow A w egzonie 5 genu, powodujący substytucję seryny w miejsce glicyny w pozycji 168 łańcucha aminokwasowego (rs6923761). Tego typu badania, o ile wiadomo, nie były dotychczas prowadzone.

5 CEL PRACY

5.1 Ogólny cel pracy

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie związku między wybranymi polimorfizmami w białkach receptorowych a cukrzycą typu 2 i przedcukrzycowymi cechami ilościowymi.

5.2 Cele szczegółowe

- Zbadanie częstości występowania polimorfizmów w genach białek receptorowych: PPAR γ (Pro12Ala) i receptora GLP1 (Gly168Ser i Phe260Leu) w populacji osób chorych i niechorujących na cukrzycę typu 2 z regionu Małopolski.
- Ocena związku (*association*) alleli i genotypów PPAR γ Pro12Ala oraz GLP1R Phe260Leu i Gly168Ser z cukrzycą typu 2 w badaniu kliniczno – kontrolnym (*case-control study*) niespokrewnionych osób chorujących i niechorujących na tę chorobę.
- Ocena związku (*association*) alleli i genotypów PPAR γ Pro12Ala oraz GLP1 Phe260Leu i Gly168Ser z przedcukrzycowymi cechami ilościowymi w grupie niechorujących na cukrzycę.
- Zbadanie częstości występowania mutacji PPAR γ Pro115Gln wśród osób otyłych o BMI większym lub równym 35 kg/m² z regionu Małopolski

6 MATERIAŁ I METODYKA

6.1 Grupa badana

Badaniem objęto grupę 462 niespokrewnionych pacjentów Katedry i Kliniki Chorób Metabolicznych Collegium Medicum UJ z klinicznym rozpoznaniem cukrzycy typu 2 i 428 ochotników niechorujących na tę chorobę, rekrutujących się głównie spośród pacjentów i pracowników Kliniki i ich współmałżonków. Wszyscy wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniu. Zostało ono zaaprobowane przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Kliniczne rozpoznanie cukrzycy typu 2 oparte było na:

- obecności cukrzycy, zdiagnozowanej po 35. roku życia oraz
- co najmniej dwuletniego okresu leczenia dietą lub doustnymi lekami hipoglikemizującymi po ustaleniu rozpoznania.

Cukrzycę wykluczano na podstawie oznaczenia glikemii na czczo i braku hiperglikemii w wywiadzie. Ponadto, u części osób rekrutowanych do grupy kontrolnej wykonano doustny test obciążenia 75g glukozy z oznaczeniem glikemii i insulinemii na czczo i w 120. minucie badania. Osób, u których stwierdzono stan przedcukrzycowy, nie włączano do badania. Łącznie u 218 osób z grupy kontrolnej; 135 kobiet i 83 mężczyzn, prawidłową tolerancję glukozy zweryfikowano za pomocą OGTT. W badaniu stosowano kryteria Światowej Organizacji Zdrowia dotyczące definicji, rozpoznawania i klasyfikacji cukrzycy i jej powikłań.

Osoby z obu grup wypełniały ankietę, dotyczącą: dla chorych na cukrzycę: wieku rozpoznania choroby, sposobu leczenia, przewlekłych powikłań; dla obu grup – innych chorób, stosowanych leków, nałogu palenia tytoniu, wywiadu rodzinnego odnośnie do cukrzycy typu 2 i innych kwestii zdrowotnych (vide załącznik). Pobierano im krew do badań genetycznych i biochemicznych. Materiał genetyczny oraz dane ankietowe i wyniki innych badań zostały zgromadzone przez Klinikę Chorób Metabolicznych w latach 1999 – 2006. Charakterystykę kliniczną podgrup badania kliniczno – kontrolnego przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Porównanie grup w badaniu kliniczno – kontrolnym (zmienne jakościowe test chi-2, ilościowe – test Wilcoxon)

Cecha	Grupa badana	Grupa kontrolna	p dla
-------	--------------	-----------------	-------

			<i>różnicy</i>
Wiek w chwili badania [lata]	58,6 (+-10,0)	49,8(+14,8)	<0,0001
% mężczyzn	45,8%	39,9%	0,07
Masa ciała [kg]	87,9(+18,9)	86,1(+22,0)	0,06
BMI [kg/m ²]	31,5(+6,6)	30,8 (+7,9)	0,0012
Wiek diagnozy [lata]	49,2 (+9,5)		
Czas trwania cukrzycy [lata]	9,4(+7,9)		
Cholesterol [mmol/l]	5,8(+8,0)	5,5(+1,1)	0,88
HDL-cholesterol [mmol/l]	1,3(+0,7)	1,4(+0,5)	0,0008
LDL-cholesterol [mmol/l]	3,0(+1,0)	3,2(+1,0)	0,0025
TG[mmol/l]	2,3(+1,9)	1,7(+1,3)	<0,0001
Leczonych insuliną	52,2%		
Czas do włączenia insuliny (dla leczonych insuliną)	7,6(+5,6)		
Mocznik [mmol/l]	6,3(+2,6)		
Kreatynina [μmol/l]	78,4(+24,4)		
Albumina/kreatynina [mg/mmol]	14,4(+58,2)		
HbA1c (średnia z 2 pomiarów) [%]	7,6(+1,4)		
Wywiad rodzinny dodatni	47,5%		
Glukoza na czczo [mmol/l]		4,8(+0,7)	
Glukoza po obciążeniu [mmol/l]		5,1(+1,6)	
Insulina na czczo [μIU/ml]		11,8(+8,5)	
Insulina po obciążeniu [μIU/ml]		42,6(+41,3)	

Parametry wyrażone jako wartość średnia +-SD

Z osób należących do obu podgrup wyselekcjonowano 191 chorych otyłych ze wskaźnikiem masy ciała (*body mass index* - BMI) większym lub równym 35, u których wykonano genotypowanie pod kątem mutacji PPAR γ Pro115Gln. Wśród nich znalazło się 108 chorych na cukrzycę typu 2 i 83 niechorujących, 131 kobiet i 60 mężczyzn. Średni wskaźnik masy ciała wyniósł 41,51 (SD+5,62), wiek w chwili badania 45,3(+11,9) roku, średnie stężenie w surowicy cholesterolu całkowitego – 5,4mmol/l (+1,63), cholesterolu frakcji LDL – 3,14(+0,99), cholesterolu frakcji HDL – 1,24mmol/l(+0,44), trójglicerydów 2,30mmol/l(+1,54).

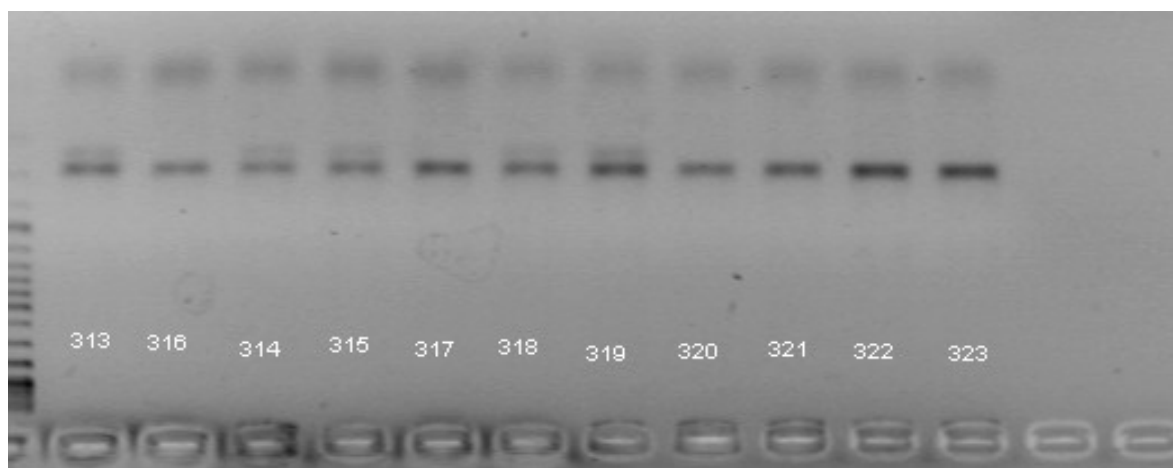
6.2 Izolacja DNA i genotypowanie

DNA badanych osób zostało wyizolowane z limfocytów krwi obwodowej według protokołu opartego o detergent guanidynowy (DNAzol Reagent, GIBCO, USA) . U wszystkich badanych genotypowano polimorfizmy PPAR γ : Pro12Ala i receptora GLP1: Phe260Leu oraz Gly168Ser metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (*polymerase chain reaction* - PCR) i zmiennej długości fragmentów restrykcyjnych (*restriction fragments length polymorphism* - RFLP). U osób otyłych z BMI większym lub równym 35 kg/m² genotypowano polimorfizm PPAR γ Pro115Gln tą samą metodą.

6.2.1 Genotypowanie polimorfizmu PPAR γ Pro12Ala

Fragment DNA obejmujący locus polimorfizmu był namnażany z użyciem uprzednio opublikowanych primerów : sensownego GACAAAATATCAGTGTGAATTACAGC i antysensownego CCCAATAGCCGTATCTGGAAAGG oraz polimerazy Taq firmy Qiagen (USA) – warunki PCR ujęto w tabeli 4 – a następnie trawiony enzymem restrykcyjnym Bsh1236I firmy Fermentas (Litwa), który w obecności allelu Ala rozkłada produkt PCR o długości 270 bp (*base pairs* – par zasad) na fragmenty 227 i 43 bp. Po trawieniu produkt PCR był rozdzielany elektroforetycznie i uwidaczniany na żelu agarozowym o stężeniu 3,2% barwionym bromkiem etydyny. Wyniki były rejestrowane przy użyciu kamery cyfrowej firmy Vilber-Lourmat (Francja) i zachowywane jako dokumenty komputerowe w programie BioCapt. Przykładowy wynik genotypowania polimorfizmu Pro12Ala w genie PPAR γ przedstawia rycina 4.

Ryc. 4. Przykładowy wynik genotypowania polimorfizmu Pro12Ala w genie PPAR γ .

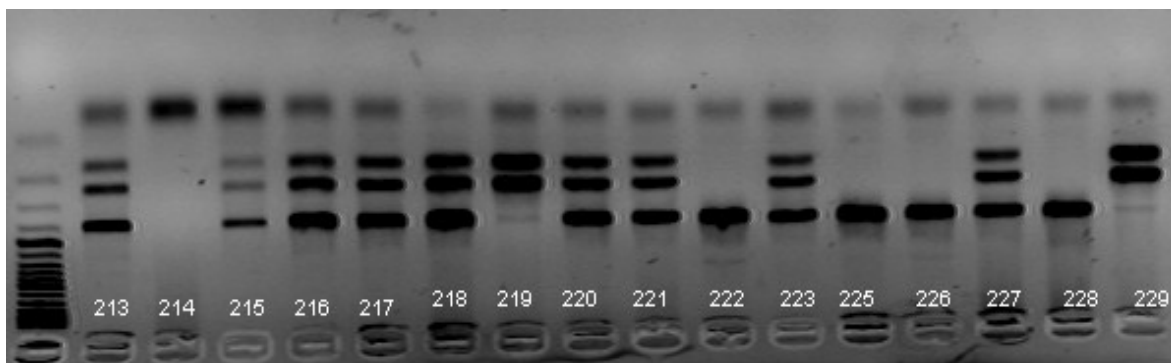


6.2.2 Genotypowanie polimorfizmu GLP1R Gly168Ser

Fragment DNA obejmujący locus polimorfizmu był namnażany z użyciem nowo zaprojektowanych primerów: sensownego TCTCITTCTTGGTCTTGGTATCCCC i antysensownego CAACCTCATATTCTACGGTCAGGGC oraz polimerazy Taq firmy Qiagen (USA), w warunkach podanych w tabeli 4, a następnie trawiony enzymem restrykcyjnym DdeI firmy Fermentas (Litwa), który w obecności allelu Gly rozkłada produkt PCR o długości 398 bp na fragmenty 266 i 132 bp. Po trawieniu produkt PCR był rozdzielany elektroforetycznie i uwidaczniany na żelu agarozowym o stężeniu 3,2% barwionym bromkiem etydyny. Wyniki były

rejestrowane i zapisywane jak to opisano powyżej. Przykładowy wynik genotypowania polimorfizmu Gly168Ser w genie GLP1R przedstawiono na rycinie 5.

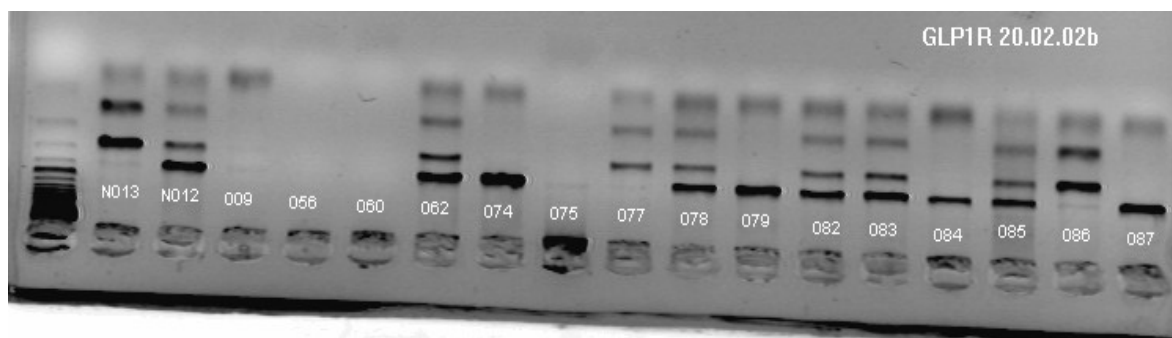
Ryc. 5. Przykładowy wynik genotypowania polimorfizmu Gly168Ser w genie GLP1R.



6.2.3 Genotypowanie polimorfizmu GLP1R Phe260Leu

Fragment DNA obejmujący locus polimorfizmu był namnażany z użyciem nowo zaprojektowanych primerów: sensownego CAGATAAAGTCCTTAGCACTAGCCC i antysensownego CAAGTACCATGTTAGAAGAGGGGTC oraz polimerazy Taq firmy Qiagen (USA), a następnie trawiony enzymem restrykcyjnym BbsI firmy Fermentas (Litwa), który w obecności allelu rozkłada produkt PCR o długości 395 bp (base pairs – par zasad) na fragmenty 273 i 122bp. Po trawieniu produkt PCR był rozdzielany elektroforetycznie i uwidaczniany na żelu agarozowym o stężeniu 3,2% barwionym bromkiem etydyny. Wyniki były rejestrowane i zachowywane jak opisano powyżej. Przykładowy wynik genotypowania polimorfizmu Phe260Leu w genie GLP1R przedstawiono na rycinie 6.

Ryc. 6. Przykładowy wynik genotypowania polimorfizmu Phe260Leu w genie GLP1R



6.2.4 Genotypowanie mutacji PPAR γ Pro115Gln

Fragment DNA obejmujący locus polimorfizmu był namnażany z użyciem uprzednio opublikowanych primerów : sensownego TGCAATCAAAGTGGAGCC i antysensownego CAGAAGCTTTATCTCCACAGAC oraz polimerazy Taq firmy Promega (USA). Primer sensowny został zaprojektowany przez zmianę trzeciego nukleotydu od końca 3' w ten sposób, że powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego dla enzymu HindII w obecności mutacji Pro115Gln (mutacja sama w sobie nie generuje nowego miejsca restrykcyjnego). Warunki PCR podano w tabeli 4. Produkt PCR był następnie trawiony enzymem restrykcyjnym HincII (izoschizomer enzymu HindII) firmy Fermentas (Litwa), który w obecności allelu Gln rozkłada produkt PCR o długości 129bp na fragmenty 105 i 24bp. Po trawieniu produkt PCR był rozdzielany elektroforetycznie i uwidaczniany na żelu agarozowym o stężeniu 3,2% barwionym bromkiem etydyny. Wyniki były rejestrowane przy użyciu kamery cyfrowej i zachowane jako dokumenty komputerowe w programie BioCapt.. Ze względu na rzadkość mutacji Pro115Gln genu PPAR γ zastosowano kontrolę trawienia enzymem restrykcyjnym, polegającą na jednoczesnym trawieniu produktu ampifikacji fragmentu genu receptora melanokortyny – 4 (*melanocortin-4-receptor* - MC4R), zawierającego miejsce restrykcyjne dla enzymu HincII. Przykładowy wynik genotypowania mutacji Pro115Gln w genie PPAR γ przedstawiono na rycinie 7.

Ryc. 7. Przykładowy wynik genotypowania mutacji Pro115Gln w genie PPAR γ . Tory od trzeciego do piątego od prawej zajmują produkty PCR, obejmujące fragment genu MC4R, zawierający miejsce restrykcyjne dla enzymu HincII, stanowiące kontrolę trawienia. Część z nich

nie była trawiona (oznaczone NIE), część zaś poddawana trawieniu (oznaczone TR) powodującemu odszczepienie krótkiego fragmentu DNA, niewidocznego na zdjęciu.

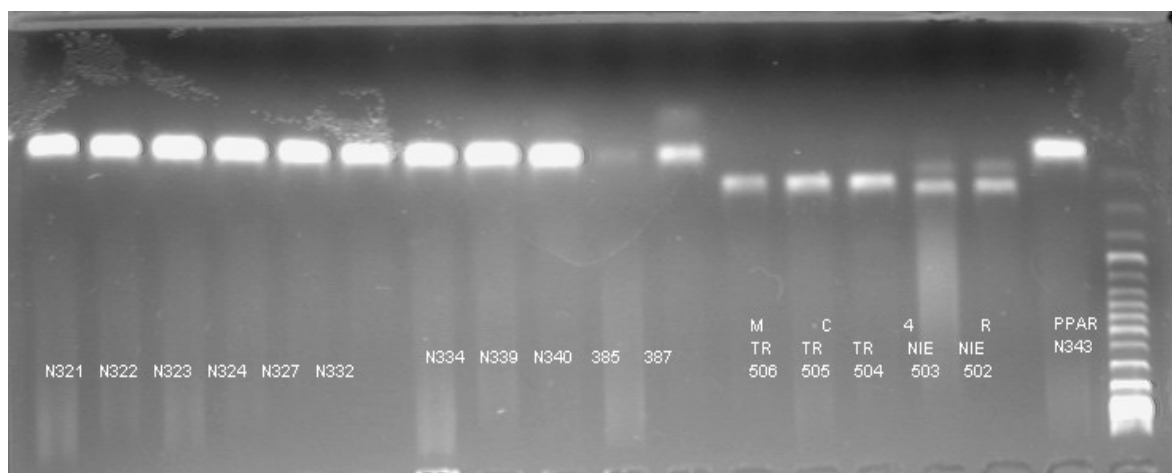


Tabela 4. Warunki łańcuchowych reakcji polimerazy wykonywanych w ramach niniejszej pracy

Lp	Etap PCR	Polimorfizm			
		PPAR γ Pro12Ala	PPAR γ Pro115Gln	GLP1R Gly168Ser	GLP1 Phe260Leu
1.	Początkowa denaturacja	94°C/5min	94°C/5min	94°C/5min	94°C/15min
2.	Denaturacja	94°C/45s	94°C/45s	94°C/45s	94°C/45s
3.	Przylączenie primerów	54,5°C/45s	61°C/45s	54°C/45s	53°C/45s
4.	Elongacja	72°C/45s	72°C/45s	72°C/45s	72°C/45s
5.	Ilość cykli (punkt 2-4)	39	35	39	39
6.	Końcowa elongacja	72°C/10min	72°C/10min	72°C/10min	72°C/10min

6.3 Badania antropometryczne

U wszystkich osób biorących udział w badaniu dokonano pomiarów antropometrycznych: wzrostu i wagi.

6.4 Oznaczenia biochemiczne

Każdemu choremu włączonemu do badania pobrano krew żylną do oznaczenia glikemii w godzinach porannych, na czczo. Glikemię oznaczano przy użyciu metody enzymatycznej

(peroksydazowej) stosując zestawy firmy Roche/Hitachi Glucose GOD – PAP na aparacie Hitachi 917 firmy Roche Diagnostics GmbH (Niemcy).

U części osób z grupy kontrolnej, u których wykonano doustny test obciążenia 75g glukozy z oznaczeniem glikemii i insulinemii (vide rozdział 6.1. „Grupa badana”), insulinemię oznaczano metodą immunologiczną przy użyciu zestawów Insulin CalSet do aparatu Elecsys 2010 firmy Roche Diagnostic (Niemcy). Oznaczenia glukozy i insuliny wykonano w Zakładzie Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie (kierownik: Prof. dr hab. J. Naskalski).

6.5 Obliczenia wskaźników insulinowrażliwości i wydzielania insuliny

6.5.1 Ocena modelu homeostazy – oporności na insulinę i modelu homeostazy funkcji komórki β

W obliczeniach stosowano wzór na ocenę modelu homeostazy – oporności na insulinę (*homeostasis model assessment – insulin resistance - HOMA – IR*) :

$$\text{INS } 0 \text{ min } [\mu\text{IU/ml}] \times \text{GLU } 0 \text{ min } [\text{mmol/l}] / 22,5$$

(INS – stężenie insuliny, GLU – stężenie glukozy)

W tym modelu większa oporność na insulinę łączy się z wyższymi wynikami otrzymanymi z przedstawionego wzoru. Wskaźnik HOMA-IR jest wykorzystywany do badań populacyjnych, bez powszechnie przyjętych wartości referencyjnych. Zakres otrzymywanych wyników waha się w granicach od 0,1 do 20,0, a średnie wartości charakterystyczne dla osób bez zaburzeń tolerancji glukozy wynoszą z reguły około 2,0 (dla osób z cukrzycą typu 2 około 5,0) .

Stosowano również wzór na ocenę homeostazy – funkcji komórki β (*homeostasis model assessment – β -cell function – HOMA-%B*), obliczany następująco:

$$20 \times \text{INS } 0 \text{ min } [\mu\text{IU/ml}] / (\text{GLU } 0 \text{ min } [\text{mmol/l}] - 3,5).$$

Wskaźnik ten również nie ma powszechnie przyjętych wartości referencyjnych, wyższe wyniki wskazują na większą zdolność wydzielniczą komórek β trzustki . Niekiedy, aby uniknąć ujemnych wartości współczynnika, autorzy prac wykorzystujących go wyłączają z analizy osoby z glikemią na czczo mniejszą lub równą 3,5 . W niniejszym opracowaniu wzięto pod uwagę wszystkie wyniki.

6.5.2 Wskaźniki wrażliwości na insulinę i wydzielania insuliny (*insulin sensitivity indices – ISI*) oparte na glikemii i insulinemii w trakcie doustnego testu obciążenia 75g glukozy

U 218 osób niechorujących na cukrzycę typu 2, u których oznaczono glikemię i insulinemię na czczo oraz w 120. minucie testu, obliczono współczynniki insulinowrażliwości i sekrecji insuliny opisujące zmiany metabolizmu węglowodanów w trakcie testu. Uwzględniono iloraz insulinemii i glikemii na czczo (INS 0 min / GLU 0 min); iloraz insulinemii w 120 minucie testu i na czczo (INS 120 min / INS 0 min). Obliczono także inne ilościowe wskaźniki insulinowrażliwości, które mogą być wykorzystywane w badaniach dotyczących dużych liczebnie grup:

- QUICKI, czyli: $1/(\log \text{GLU } 0 \text{ min} + \log \text{INS } 0 \text{ min})$
- $1/(\log \text{GLU } 0 \text{ min} \times \log \text{INS } 0 \text{ min})$
- $1/(\text{INS } 0 \text{ min} \times \log \text{GLU } 0 \text{ min})$
- $1/(\text{GLU } 0 \text{ min} \times \log \text{INS } 0 \text{ min})$
- ISI(composite), czyli: $10\,000 / \sqrt{[(\text{INS } 0 \text{ min} \times \text{GLU } 0 \text{ min}) \times (\text{średnia GLU podczas OGTT} \times \text{średnia INS podczas OGTT})]}$
- ISI(Gutt), czyli: $[75\,000 + (\text{GLU } 0 \text{ min} - \text{GLU } 120 \text{ min}) \times 0,19 \times \text{masa ciała}]/[120 \times \log(\text{INS } 0 \text{ min} + \text{INS } 120 \text{ min})/2 \times (\text{GLU } 0 \text{ min} + \text{GLU } 120 \text{ min})/2]$.

(Stosowane skróty: INS – stężenie insuliny ($\mu\text{IU/ml}$), GLU – stężenie glukozy(mmol/l , dla ISI composite - mg/dl), QUICKI – *quantitative insulin sensitivity check index* - ilościowy wskaźnik insulinowrażliwości, log – logarytm dziesiętny, sqr – pierwiastek kwadratowy, min – minuta, OGTT – test doustnego obciążenia glukozą)

Do obliczania wskaźnika ISI composite stosowano glikemię w mg/dl , zgodnie ze wzorem podanym w oryginalnej publikacji .

6.6 Analiza statystyczna

Przy sprawdzaniu zgodności uzyskanego rozkładu alleli i genotypów z prawem Hardy’ego i Weinberga oraz w obliczeniach dotyczących analizy związku badanych polimorfizmów z cukrzycą typu 2 stosowano test χ^2 . W obliczeniach dotyczących analizy związku badanych polimorfizmów z przedcukrzycowymi cechami ilościowymi stosowano nieparametryczny test

Wilcoxona (sumy rang) i Kruskala - Wallisa. Do obliczenia trendu wpływu genotypów użyto testu Cochran'a i Armitage'a.

Obliczeń dokonano przy użyciu programu SAS 9.1 (USA).

7 WYNIKI

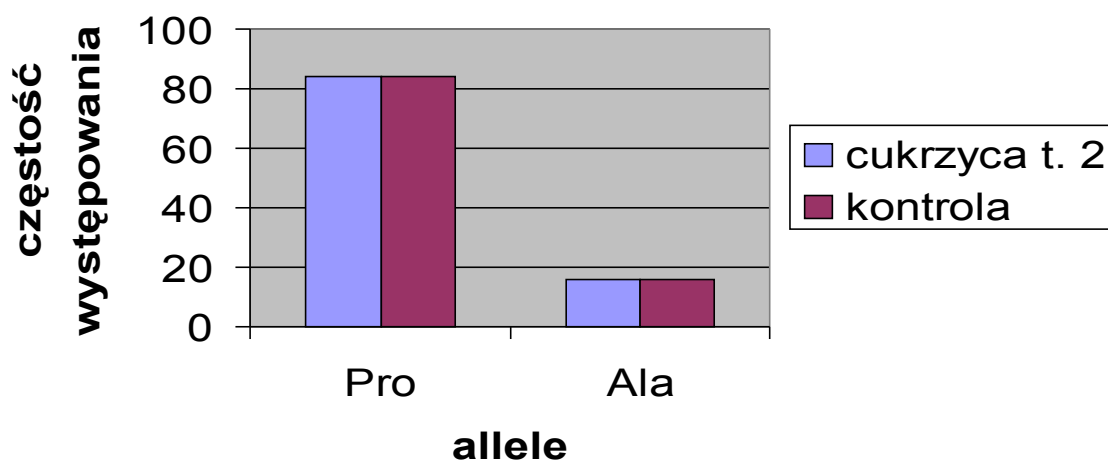
Ilość alleli i genotypów wszystkich polimorfizmów nie odbiegała od przewidywanej na podstawie prawa Hardy'ego i Weinberga (dla PPAR γ Pro12Ala $p=0,77$, dla GLP1R Gly168Ser $p=0,32$, dla GLP1R Phe260Leu $p=0,73$).

7.1 Wyniki badania związku wybranych polimorfizmów z cukrzycą typu 2

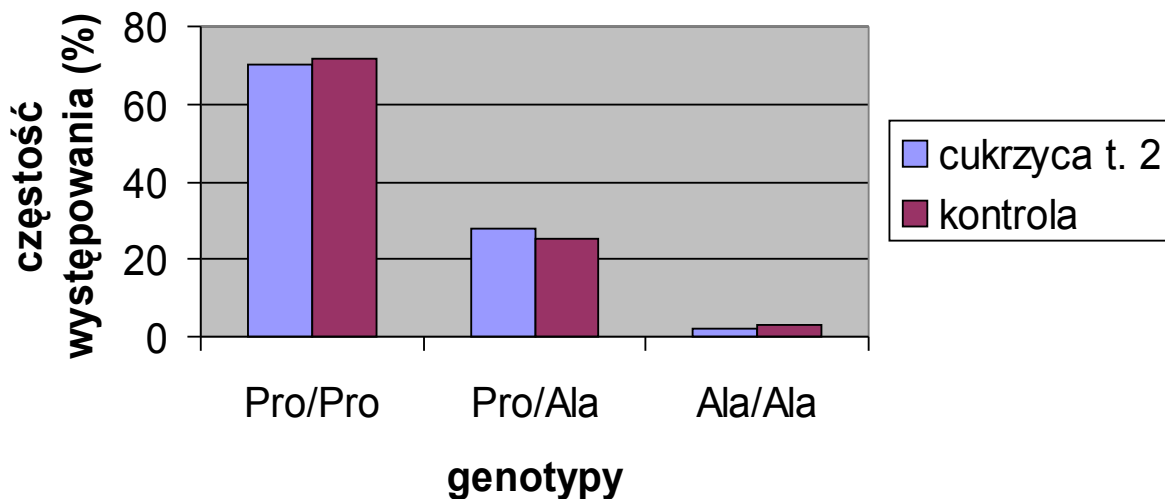
7.1.1 Polimorfizm Pro12Ala genu PPAR γ

Częstość allelu kodującego prolinę w pozycji 12 łańcucha aminokwasowego wynosiła w grupie chorych na cukrzycę typu 2 84%, alaninę - 16%, w grupie kontrolnej odpowiednio 84,1% i 15,9%. Częstość genotypów wynosiła w grupie chorych na cukrzycę: Pro/Pro – 70,1%, Pro/Ala – 27,7%, Ala/Ala – 2,2%, w grupie kontrolnej odpowiednio 71,5%; 25,2%; 3,3%. Ze względu na małą ilość homozygot pod względem allelu Ala porównano jego hetero- i homozygotycznych nosicieli z homozygotami Pro/Pro (co odpowiada modelowi dominującego efektu zmutowanego allelu). Nie stwierdzono różnic częstości występowania genotypów pomiędzy grupami ($p=0,67$). Częstość występowania alleli i genotypów w grupach: badanej i kontrolnej zestawiono odpowiednio na rycinach 8 i 9.

Ryc. 8. Częstość występowania alleli polimorfizmu PPAR γ Pro12Ala w grupie badanej i kontrolnej



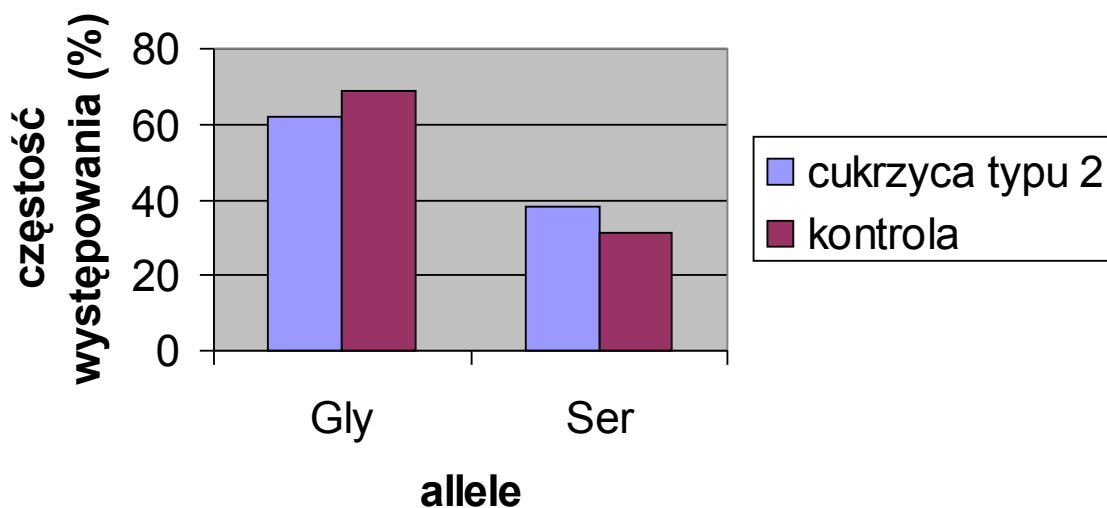
Ryc. 9. Częstość występowania genotypów polimorfizmu PPAR γ Pro12Ala w grupie badanej i kontrolnej



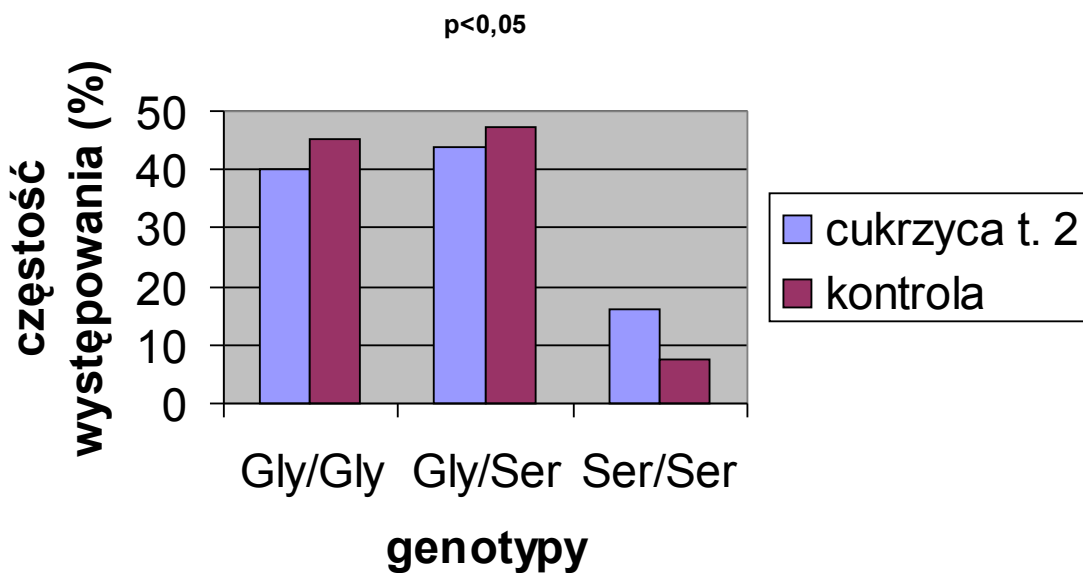
7.1.2 Polimorfizm Gly168Ser genu GLP1R

Częstość występowania allelu kodującego glicynę wynosiła w grupie chorych na cukrzycę typu 2 62%, serynę 38%, w grupie kontrolnej odpowiednio 68,9% i 31,1%. Częstość genotypów wynosiła w grupie chorych na cukrzycę: Gly/Gly – 40%, Gly/Ser – 43,9%, Ser/Ser – 16,1%, w grupie kontrolnej odpowiednio 45,2%; 47,3%; 7,5%. Stosując model addytywnego efektu allelu zmutowanego stwierdzono znamienne częstsze występowanie polimorfizmu Gly168Ser u chorych na cukrzycę typu 2 ($p=0,027$). Zależność pozostała znamienne w analizie wieloczynnikowej z uwzględnieniem wpływu wieku, płci i wskaźnika masy ciała. Ze względu na słabszy efekt trendu genotypów (dla testu trendu wpływu genotypów Cochran'a i Armitage'a $p=0,037$) i fakt, iż największa różnica częstości występowania genotypów między grupą chorych i kontrolną dotyczyła homozygot Ser/Ser, obliczono związek dla recesywnego efektu allelu zmutowanego, wykrywając silniejszą zależność (iloraz ryzyka [*risk ratio*, RR] zachorowania na cukrzycę typu 2 dla homozygot Ser/Ser w stosunku do pozostałych genotypów był równy 2,6 [95%CI – 1,32-5,2]). Częstość występowania alleli i genotypów w grupach: badanej i kontrolnej zestawiono odpowiednio na rycinach 10 i 11. Dokonano analizy stratyfikacyjnej ze względu na płeć. Częstość genotypów wyniosła u kobiet chorych na cukrzycę: Gly/Gly – 35,3%, Gly/Ser – 51%, Ser/Ser – 13,7%, w grupie kontrolnej odpowiednio 53,8%, 34,2% i 12%, u mężczyzn chorych na cukrzycę Gly/Gly – 38,8%, Gly/Ser – 46,9%, Ser/Ser – 14,3%, w grupie kontrolnej odpowiednio 44%, 44% i 12%. Stwierdzono, iż za znamienności odpowiada związek polimorfizmu z cukrzycą typu 2 u kobiet ($p=0,012$). U mężczyzn nie stwierdzono związku ($p=0,82$). Częstość występowania poszczególnych genotypów u kobiet i mężczyzn z obu grup zestawiono na rycinach 12 i 13.

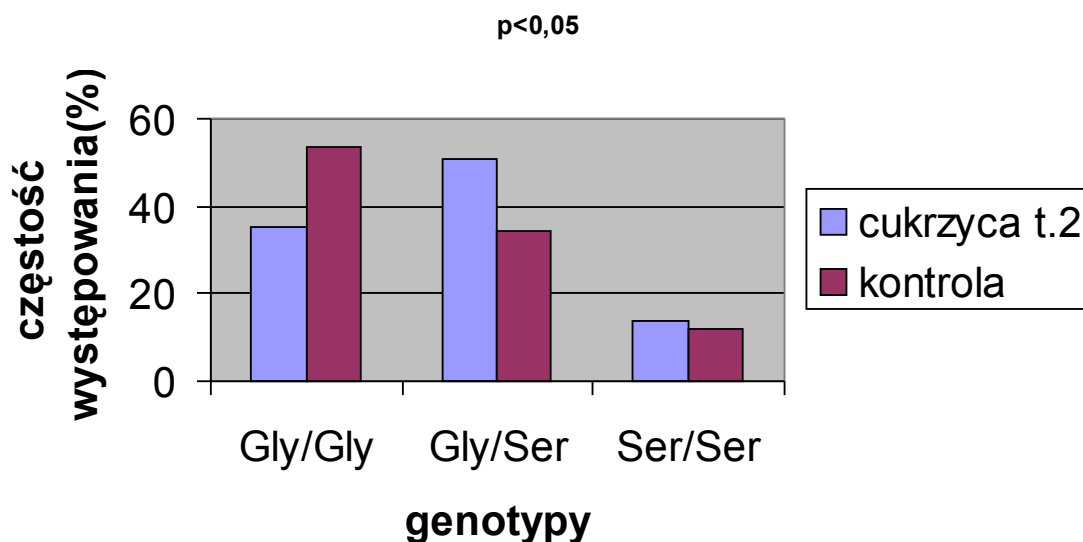
Ryc. 10. Częstość występowania alleli polimorfizmu GLP1R Gly168Ser w grupie badanej i kontrolnej



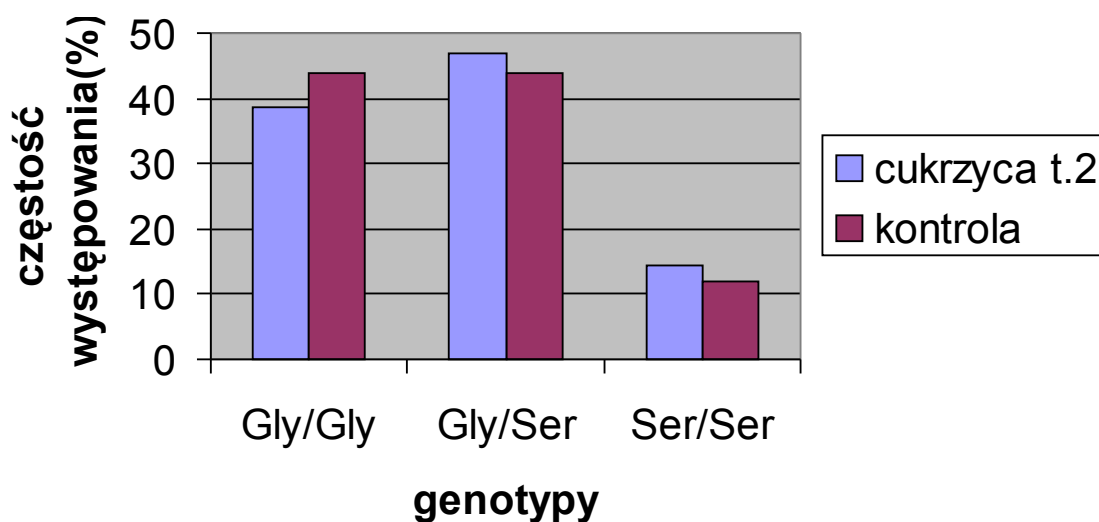
Ryc. 11. Częstość występowania genotypów polimorfizmu GLP1R Gly168Ser w grupie badanej i kontrolnej



Ryc. 12. Częstość występowania genotypów polimorfizmu GLP1R Gly168Ser u kobiet z grupy badanej i kontrolnej



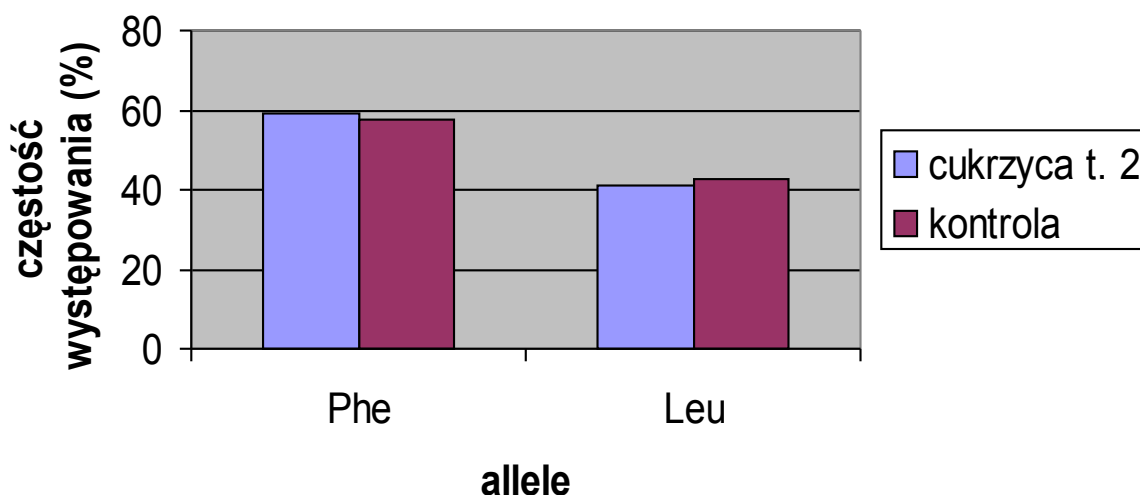
Ryc. 13. Częstość występowania genotypów polimorfizmu GLP1R Gly168Ser u mężczyzn z grupy badanej i kontrolnej



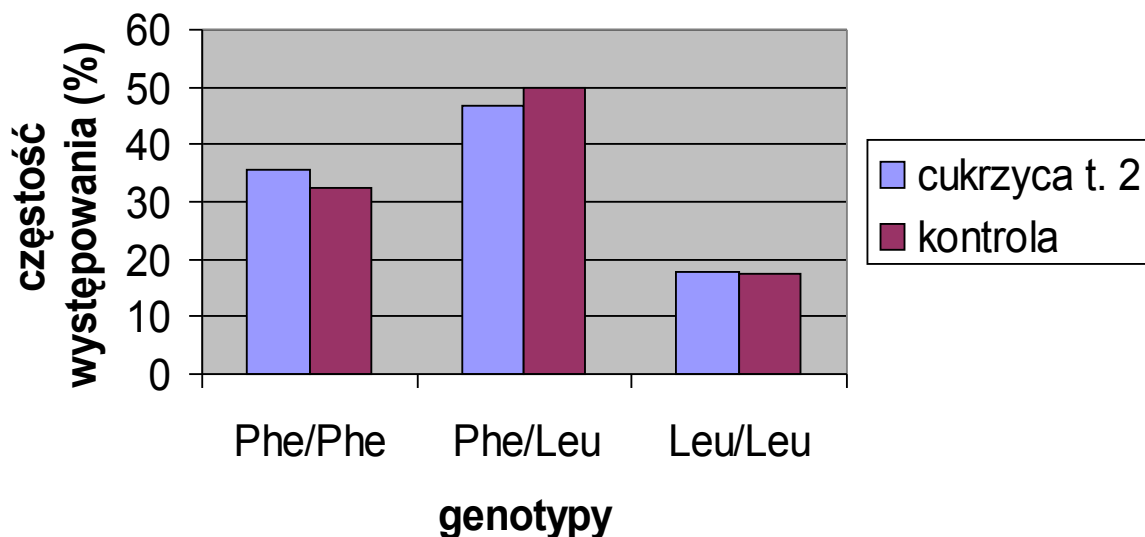
7.1.3 Polimorfizm GLP1R Phe260Leu

Częstość allelu kodującego fenyloalaninę w pozycji 260 łańcucha aminokwasowego wynosiła w grupie chorych na cukrzycę typu 2 59,0%, leucynę 41,0%%, w grupie kontrolnej odpowiednio 57,5%% i 42,5%. Częstość genotypów wynosiła w grupie chorych na cukrzycę: Phe/Phe – 35,7%, Phe/Leu – 46,6%, Leu/Leu – 17,7%, w grupie kontrolnej odpowiednio 32,5%; 49,9%; 17,6%. Stosując model addytywnego efektu allelu zmutowanego nie stwierdzono różnic częstości występowania genotypów między grupami ($p=0,56$). Częstość występowania poszczególnych alleli i genotypów zestawiono na ryc. 14 i 15.

Ryc. 14. Częstość występowania alleli polimorfizmu GLP1R Phe260Leu w grupie badanej i kontrolnej



Ryc. 15. Częstość występowania genotypów polimorfizmu GLP1R Phe260Leu w grupie badanej i kontrolnej



W tabeli 5 zestawiono wyniki badań związku wszystkich trzech opisanych wyżej polimorfizmów z cukrzycą typu 2.

Tabela 5. Zestawienie wyników badań związku wybranych polimorfizmów genetycznych z cukrzycą typu 2

	<i>Częstość genotypów</i>			
	Gly/Gly	Gly/Ser	Ser/Ser	
GLP1R Gly168Ser				
Cukrzyca typu 2	40%	43,9%	16,1%	p=0,027†
Kontrola	45,2%	47,3%	7,5%	
GLP1R Phe260Leu	Phe/Phe	Phe/Leu	Leu/Leu	
Cukrzyca typu 2	35,7%	46,6%	17,7%	p=0,56†
Kontrola	32,5%	49,9%	17,6%	
PPARγ Pro12Ala	Pro/Pro	Pro/Ala	Ala/Ala	
Cukrzyca typu 2	70,1%	27,7%	2,2%	p=0,67£
Kontrola	71,5%	25,2%	3,3%	

† - dla porównania trzech genotypów

£ - dla porównania homozygot Pro/Pro z nosicielami allelu Ala

7.2 Wyniki badania związku wybranych polimorfizmów z przedcukrzycowymi cechami ilościowymi

7.2.1 Polimorfizm Pro12Ala w genie PPAR γ

Porównywano dwie grupy: homozygot Pro/Pro oraz nosicieli allelu Ala. Wiek ani wskaźnik masy ciała nie różniły się istotnie pomiędzy grupami (odpowiednio $p=0,36$ i $p=0,94$). Nie stwierdzono różnic glikemii na czczo ($p=0,70$); glikemii w 120. minucie po obciążeniu 75g glukozy ($p=0,33$); insulinemii na czczo ($p=0,96$) i po obciążeniu ($p=0,65$); wskaźnika HOMA-IR ($p=0,93$); ilorazu insulinemii i glikemii na czczo ($p=0,91$); wskaźnika QUICKI ($p=0,93$), $1/(\log \text{GLU } 0 \text{ min} \times \log \text{INS } 0 \text{ min})$ ($p=0,91$); $1/(\text{INS } 0 \text{ min} \times \log \text{GLU } 0 \text{ min})$ ($p=0,96$); $1/(\text{GLU } 0 \text{ min} \times \log \text{INS } 0 \text{ min})$ ($p=0,86$); stosunku insulinemii w 120. minucie po obciążeniu do insulinemii na czczo ($p=0,56$); wskaźnika insulinowrażliwości Gutt ($p=0,53$); ISI composite ($p=0,91$); wskaźnika wydzielania insuliny HOMA %B ($p=0,30$).

Wartości wymienionych współczynników w obu grupach zestawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Porównanie wartości współczynników opisujących wydzielanie insuliny i insulinowrażliwość pomiędzy genotypami polimorfizmu Pro12Ala w genie PPAR γ .

Wskaźnik	Wartości dla genotypów		p dla różnicy między genotypami
	Pro/Pro	Pro/Ala i Ala/Ala	
BMI [kg/m ²]	32,27(+8,07)	32,76(+9,05)	0,94
Wiek [lata]	45,54(+14,26)	47,70(+12,07)	0,36
Glukoza 0' [mmol/l]	4,77(+0,67)	4,81(+0,87)	0,7
Glukoza 120' [mmol/l]	4,98(+1,47)	5,11(+1,48)	0,33
Insulina 0' [μ IU/ml]	11,29(+6,22)	12,97(+10,63)	0,96
Insulina 120' [μ IU/ml]	38,50(+34,04)	47,68(+50,89)	0,65
HOMA-IR	2,43(+1,43)	2,86(+2,31)	0,93
HOMA-%B	310,3(+1632,9)	203,6(+516,0)	0,30
INS 0min/GLU 0min	2,37(+1,29)	2,70(+2,41)	0,91
INS 120 min/INS 0min	2,37(+1,29)	2,70(+2,41)	0,56
QUICKI	0,62(+0,10)	0,62(+0,13)	0,93
1/(logGLU 0min x log INS 0 min)	1,62(+0,52)	1,66(+0,65)	0,91
1/(INS 0min x logGLU 0 min)	0,18(+0,11)	0,19(+0,13)	0,96
1/(GLU 0min x logINS 0min)	0,23(+0,08)	0,24(+0,10)	0,86
ISI(composite)	11,26(+9,10)	11,20(+8,56)	0,91
ISI(Gutt)	119,84(+64,72)	116,39(+62,33)	0,53

7.2.2 Polimorfizm Gly168Ser w genie GLP1R

Porównywano trzy grupy: homozygot Gly/Gly, heterozygot i homozygot Ser/Ser. Wiek i wskaźnik masy ciała nie różniły się istotnie pomiędzy grupami (odpowiednio $p=0,64$ i $p=0,22$). Insulinemia w 120. minucie testu doustnego obciążenia glukozą różniła się istotnie ($p=0,019$), wynosząc średnio dla homozygot Gly/Gly 36,61 μ IU/ml; dla heterozygot Gly/Ser – 31,51 μ IU/ml; dla homozygot Ser/Ser – 26,80 μ IU/ml. Podobnie istotną różnicę stwierdzono dla stosunku insulinemii w 120. minucie testu do insulinemii na czczo ($p=0,0229$). Dla homozygot Gly/Gly średnia wynosiła 3,48; dla heterozygot Gly/Ser – 3,03; dla homozygot Ser/Ser – 1,90. Nosiciele poszczególnych genotypów różnili się także pod względem wskaźnika insulinowrażliwości według Gutt ($p=0,0338$): średnia dla homozygot Gly/Gly - 135,37; dla heterozygot Gly/Ser – 125,74; dla homozygot Ser/Ser – 117,16.

Nie stwierdzono różnic glikemii na czczo ($p=0,46$); glikemii w 120. minucie po obciążeniu 75g glukozy ($p=0,12$); insulinemii na czczo ($p=0,22$) i po obciążeniu ($p=0,19$); wskaźnika HOMA-IR ($p=0,15$); ilorazu insulinemii i glikemii na czczo ($p=0,19$); wskaźnika QUICKI ($p=0,15$), $1/(\log \text{GLU } 0 \text{ min} \times \log \text{INS } 0 \text{ min})$ ($p=0,15$); $1/(\text{INS } 0 \text{ min} \times \log \text{GLU } 0 \text{ min})$ ($p=0,18$); $1/(\text{GLU } 0 \text{ min} \times \log \text{INS } 0 \text{ min})$ ($p=0,11$); ISI composite ($p=0,0681$) – jakkolwiek zaznaczony był trend do

jego mniejszych wartości u homozygot Ser/Ser; wskaźnika wydzielania insuliny HOMA %B ($p=0,34$).

W związku z faktem, iż największe różnice w badanych parametrach stwierdzano między homozygotycznymi nosicielami allelu kodującego serynę w pozycji 168 łańcucha aminokwasowego receptora GLP1 a pozostałymi dwoma grupami, dokonano porównania wskaźników zakładającego recesywny efekt polimorfizmu (wartości u homozygot Ser/Ser w stosunku do połączonych grup homozygot Gly/Gly i heterozygot). W takim modelu znamienność statystyczna obserwowanych różnic zwiększyła się: dla insulinemii w 120. minucie testu doustnego obciążenia glukozą do $p=0,0055$, dla stosunku insulinemii w 120. minucie testu do insulinemii na czczo $p=0,0060$; dla wskaźnika insulinowrażliwości według Gutt do $p=0,019$. Stwierdzono również istotnie mniejszą glikemii i insulinemii w 120. minucie testu u homozygot Ser/Ser w porównaniu z nosicielami allelu Gly (p równe odpowiednio 0,04 i 0,0055).

Nieznamienne pozostały różnice między grupami: wieku ($p=0,15$), wskaźnika masy ciała ($p=0,44$), glikemii na czczo ($p=0,72$); insulinemii na czczo ($p=0,38$); wskaźnika HOMA-IR ($p=0,42$); ilorazu insulinemii i glikemii na czczo ($p=0,30$); wskaźnika QUICKI ($p=0,42$), $1/(\log \text{GLU } 0 \text{ min} \times \log \text{INS } 0 \text{ min})$ ($p=0,44$); $1/(\text{INS } 0 \text{ min} \times \log \text{GLU } 0 \text{ min})$ ($p=0,38$); $1/(\text{GLU } 0 \text{ min} \times \log \text{INS } 0 \text{ min})$ ($p=0,37$); wskaźnika wydzielania insuliny HOMA %B ($p=0,34$).

Wartości wskaźników dla poszczególnych genotypów zestawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Porównanie wartości wskaźników opisujących wydzielanie insuliny i insulinowrażliwość pomiędzy genotypami polimorfizmu Gly168Ser w genie GLP1R. Czcionką pogrubioną zaznaczono różnice istotne statystycznie.

Wskaźnik	Wartości dla genotypów			p dla różnicy między genotypami
	Gly/Gly	Gly/Ser	Ser/Ser	
BMI [kg/m ²]	29,83(+8,34)	29,35(+7,72)	28,66(+6,26)	0,22
Wiek [lata]	47,5(+16)	48,97(+15,76)	51,45(+17,77)	0,64
Glukoza 0' [mmol/l]	4,57(+0,78)	4,78(+0,76)	4,74(+0,59)	0,46
Glukoza 120' [mmol/l]	4,97(+1,45)	5,19(+1,89)	5,34(+0,83)	0,12
Insulina 0' [μIU/ml]	10,86(+7,47)	11,08(+6,47)	9,63(+4,51)	0,22
Insulina 120' [μIU/ml]	36,61(+38,52)	31,51(+23,05)	26,80(+21,10)	0,019
HOMA-IR	2,46(+2,17)	2,33(+1,46)	2,02(+1,07)	0,15
HOMA-%B	448,1(+2608,4)	169,9(+444,4)	200,7(+654,1)	0,34
INS 0min/GLU 0min	2,60(+2,51)	2,40(+1,42)	2,07(+0,89)	0,19
INS 120 min/INS 0min	3,48(+2,60)	3,03(+2,51)	2,78(+0,74)	0,0229
QUICKI	0,64(+0,12)	0,62(+0,10)	0,64(+0,12)	0,15
1/(logGLU 0min x log INS 0 min)	1,77(+0,62)	1,66(+1,51)	1,76(+0,66)	0,15
1/(INS 0min x logGLU 0 min)	0,21(+0,13)	1,84(+0,10)	0,20(+0,13)	0,18
1/(GLU 0min x logINS 0min)	0,26(+0,10)	0,24(+0,08)	0,26(+0,11)	0,11
ISI(composite)	13,94(+8,72)	11,89(+7,05)	8,63(+3,91)	0,681
ISI(Gutt)	135,37(+64,35)	125,74(+57,92)	117,16(+54,94)	0,0338

7.2.3 Polimorfizm Phe260Leu w genie GLP1R

Porównywano trzy grupy: homozygot Phe/Phe, heterozygot i homozygot Leu/Leu. Średnia wieku i średni wskaźnik masy ciała nie różniły się pomiędzy grupami (odpowiednio $p=0,83$ i $p=0,91$).

Nie stwierdzono różnic glikemii na czczo ($p=0,93$); glikemii w 120. minucie po obciążeniu 75g glukozy ($p=0,13$); insulinemii na czczo ($p=0,46$) i po obciążeniu ($p=0,77$); wskaźnika HOMA-IR ($p=0,41$); ilorazu insulinemii i glikemii na czczo ($p=0,56$); wskaźnika QUICKI ($p=0,41$), $1/(\log \text{GLU } 0 \text{ min} \times \log \text{INS } 0 \text{ min})$ ($p=0,45$); $1/(\text{INS } 0 \text{ min} \times \log \text{GLU } 0 \text{ min})$ ($p=0,43$); $1/(\text{GLU } 0 \text{ min} \times \log \text{INS } 0 \text{ min})$ ($p=0,49$); stosunku insulinemii w 120. minucie po obciążeniu do insulinemii na czczo ($p=0,82$); wskaźnika insulinowrażliwości Gutt ($p=0,44$); ISI composite ($p=0,60$); wskaźnika wydzielania insuliny HOMA %B ($p=0,79$).

Wartości wymienionych wskaźników dla poszczególnych genotypów zestawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Porównanie wartości wskaźników opisujących wydzielanie insuliny i insulinowrażliwość pomiędzy genotypami polimorfizmu Phe260Leu w genie GLP1R

Wskaźnik	Wartości dla genotypów			p dla różnicy między genotypami
	Phe/Phe	Phe/Leu	Leu/Leu	
BMI [kg/m ²]	30,78(+/-6,58)	31,63(+/-8,78)	29,92(+/-7,75)	0,91
Wiek [lata]	49,48(+/-15,47)	49,55(+/-14,56)	49,39(+/-15,86)	0,83
Glukoza 0' [mmol/l]	4,77 (+/-0,68)	4,85 (+/-0,75)	4,78(+/-0,79)	0,93
Glukoza 120' [mmol/l]	4,87(+/-1,46)	5,23(+/-1,39)	5,10(+/-1,54)	0,13
Insulina 0' [μIU/ml]	10,64(+/-5,90)	12,90(+/-10,34)	11,379(+/-7,68)	0,46
Insulina 120' [μIU/ml]	36,91(+/-32,98)	44,25(+/-39,87)	42,78(+/-40,28)	0,77
HOMA-IR	2,31(+/-1,37)	2,94(+/-2,57)	2,55(+/-1,89)	0,41
HOMA-%B	173,8(+/-214,2)	388,8(+/-1969,0)	192,6(+/-278,1)	0,79
INS 0min/GLU 0min	2,29(+/-1,17)	2,78(+/-2,29)	2,35(+/-1,47)	0,56
INS 120 min/INS 0min	3,73(+/-3,20)	3,62(+/-2,36)	4,41(+/-3,90)	0,82
QUICKI	0,62(+/-0,11)	0,60(+/-0,11)	0,63(+/-0,12)	0,41
1/(logGLU 0min x log INS 0 min)	1,67(+/-0,56)	1,58(+/-0,55)	1,70(+/-0,63)	0,45
1/(INS 0min x logGLU 0 min)	0,20(+/-0,14)	0,17(+/-0,11)	0,19(+/-0,13)	0,43
1/(GLU 0min x logINS 0min)	0,25(+/-0,14)	0,23(+/-0,09)	0,24(+/-0,10)	0,45
ISI(composite)	11,34(+/-8,22)	10,83(+/-8,87)	12,26(+/-8,43)	0,60
ISI(Gutt)	125,56(+/-68,18)	112,67(+/-63,36)	123,62(+/-61,30)	0,44

7.3 Wyniki poszukiwania mutacji PPAR γ Pro115Gln u osób otyłych ze wskaźnikiem masy ciała ≥ 35

Wśród osób o wskaźniku masy ciała nie stwierdzono nosicieli mutacji Pro115Gln w genie PPAR γ . Wszyscy badani byli homozygotami Pro/Pro.

8 Dyskusja

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy poszukiwania związku polimorfizmów w genach białek receptorowych z cukrzycą typu 2 i przedcukrzycowymi cechami ilościowymi w populacji Polski południowej objęły zarówno warianty wcześniej już badane w tym kontekście (polimorfizm Pro12Ala i mutacja Pro115Gln genu PPAR γ), jak i takie, co do których nie prowadzono dotychczas badań (polimorfizmy Gly168Ser i Phe260Leu genu GLP1R).

Należy zaznaczyć, że praca niniejsza, jako badanie przekrojowe z formalnego punktu widzenia stanowi jedynie opis związków o charakterze statystycznym. Nie są one równoznaczne z relacjami o charakterze przyczynowo-skutkowym między badanymi czynnikami genetycznymi a ocenianym fenotypem. Niemniej jednak, opierając się na otrzymanych wynikach można próbować takiego wnioskowania, szczególnie przy uwzględnieniu dotychczasowej wiedzy z opublikowanych badań patofizjologicznych, epidemiologicznych, prospektywnych obserwacji oraz analiz genetycznych.

8.1 Związek polimorfizmu Pro12Ala genu PPAR γ z cukrzycą typu 2

W ramach prezentowanego badania nie udało się potwierdzić wykazanego w wielu pracach związku polimorfizmu powodującego substytucję alaniny w miejsce proliny w pozycji 12 łańcucha aminokwasowego receptora jądrowego PPAR γ . Może to wynikać z niedoskonałości metodologicznych, może jednak również odzwierciedlać rzeczywisty brak tej zależności w badanej populacji. Istnieją argumenty przemawiające za tą drugą możliwością.

Częstość występowania allelu kodującego alaninę w pozycji 12 łańcucha aminokwasowego była zbliżona do raportowanych w innych badaniach dla rasy kaukaskiej w grupie chorych na cukrzycę typu 2 (15,9%) i w grupie kontrolnej (16%). Na przykład w badaniu przeprowadzonym w populacji francuskiej częstość allelu kodującego alaninę w pozycji 12 wyniosła od 8% w grupie bez cukrzycy i otyłości do 11% wśród chorych na cukrzycę typu 2 (różnice nie były istotne statystycznie), w innym badaniu w tejże populacji odpowiednio 11% i 10%. W populacji włoskiej wynosiła ona 13% u chorych na cukrzycę typu 2 i 18,3% u niechorujących; w skandynawskiej 14,6% wśród chorych na cukrzycę typu 2 i 16,8% wśród niechorujących, w

populacji kanadyjskiej zaś odpowiednio 9,4% i 13,5% . Chociaż w większości z wymienionych powyżej artykułów nie stwierdzono istotnej różnicy częstości występowania polimorfizmu , ich metaanaliza dokonana przez Altshulera i wsp. w ramach cytowanej już pracy wykazała istnienie związku polimorfizmu Pro12Ala z cukrzycą typu 2 z ilorazem ryzyka (*risk ratio*) dla allelu alaniny podobnym, jak ustalony na własnym materiale autorów (0,79). Wskazują oni na małe liczebności badanych grup jako na przyczynę niepowodzeń prób replikacji zależności. We wszystkich jednak opracowaniach, których wyniki zostały włączone do metaanalizy, dało się zauważyć co najmniej trend w kierunku częstszego występowania allelu alaniny u osób bez cukrzycy. W niniejszej pracy nie stwierdzono takiego zjawiska, mimo że liczebność grup badanych była porównywalna lub większa od liczebności grup, w których były wykonane wzmiankowane badania.

Kolejne badania przynosiły przeważnie potwierdzenie związku lub wykazywały trend w kierunku ochronnego działania allelu kodującego alaninę. Ciekawym przykładem jest tu praca wykonana na populacji fińskiej, w której stwierdzono istotnie różną częstość występowania polimorfizmu wśród 522 chorych na cukrzycę typu 2 - 15% i w grupie kontrolnej składającej się z 220 osób starszych bez cukrzycy – 22% ($p=0,0007$), natomiast granicznie znamienne była różnica pomiędzy grupą chorych i 193 – osobową grupą kontrolną dobraną spośród ich małżonków bez cukrzycy (częstość allelu Ala – 19%) ($p=0,067$). Warto zwrócić tu uwagę, iż znamienność statystyczną odnotowano tu przy liczebności grupy badanej porównywalnej z jej liczebnością w niniejszym badaniu i niewielkiej grupie kontrolnej. Przyczynę tego należy zapewne upatrywać w doborze kontroli. Starsze osoby (w cytowanym badaniu średnia wieku 70 lat), które nie rozwinęły cukrzycy typu 2 można uznać za nosicieli szczególnie korzystnej konstelacji wariantów genetycznych, zabezpieczających je przed zachorowaniem. Im młodsze osoby znajdują się w grupie kontrolnej badania przekrojowego, tym większy potencjalny błąd wynikający z faktu, iż część z nich stanowią nosiciele alleli, które spowodują zachorowanie na cukrzycę w ciągu dalszego życia. Stosunkowo mała średnia wieku osób z grupy kontrolnej to ograniczenie prezentowanego badania. Należy jednak zwrócić uwagę, iż w cytowanej powyżej pracy porównanie z młodszą grupą kontrolną, dobraną spośród małżonków chorych, ponad dwukrotnie mniej liczną niż zebrana w ramach niniejszego badania, w przeciwieństwie do niego wskazuje na częstsze występowanie allelu alaniny wśród niechorujących na cukrzycę na granicy znamienności.

Związek polimorfizmu Pro12Ala w genie PPAR γ udało się potwierdzić na niewielkiej próbie w populacji czeskiej . Wśród 133 chorych na cukrzycę typu 2 2,26% było homozygotycznymi nosicielami allelu alaniny, 23,31% stanowiły heterozygoty a 74,44%

homozygoty Pro/Pro. W grupie kontrolnej odsetki nosicieli poszczególnych genotypów wynosiły odpowiednio: 6,19; 30,93 i 62,89. Częstość występowania allelu alaniny w grupie chorych wyniosła 13,91%, w grupie kontrolnej 21,34% ($p=0,022$). Średnia wieku w grupie chorych wynosiła 65,3 roku. Autorzy badania nie podają charakterystyki klinicznej grupy kontrolnej (rekrutowanej spośród dawców krwi), co utrudnia ustosunkowanie się do wyniku.

Wprawdzie w podobnym badaniu na populacji czeskiej, którego wyniki opublikowano wcześniej, różnica częstości występowania polimorfizmu u chorych na cukrzycę (13,7%) i osób o prawidłowej tolerancji glukozy (8,7%) nie osiągnęła istotności statystycznej ($p=0,087$), jednak mogło to być spowodowane małą liczebnością badanych – grupa chorych na cukrzycę typu 2 liczyła 183 osoby, zdrowych – 69 osób.

Wynik odmienny niż niniejsza praca dało badanie autorów amerykańskich, którzy dla oceny wpływu stratyfikacji populacyjnej na wyniki genetycznych badań związku dokonali oceny związku polimorfizmu Pro12Ala z cukrzycą typu 2 w kilku populacjach, w tym polskiej. Wykonane zostało ono na grupie uzyskanej z komercyjnej bazy DNA i danych (o cechach klinicznych probandów, wywiadach rodzinnych oraz wynikach badań dodatkowych) Global Repository™ firmy Genomic Collaborative Inc. Zgenotypowano 500 chorych i 500 niechorujących dobranych parami pod względem wieku, płci, wskaźnika masy ciała i wywiadu, w tym wywiadu rodzinnego odnośnie do chorób towarzyszących. Stwierdzono istnienie silnego związku ($p=0,0003$). Niestety, poza informacją, że wszyscy badani pochodzili z jednego obszaru, nie podano bliższych danych charakteryzujących tę populację. Nie udało się ich uzyskać także przez korespondencję z autorami. Można zatem jedynie próbować tłumaczyć znaczącą różnicę między naszymi wynikami tym, że badani mogli pochodzić z terenów odległych od siebie. Przyczynę wyniku fałszywie dodatniego można upatrywać również w rekrutacji do grup badanej i kontrolnej osób spokrewnionych, tym samym dzielących wiele alleli, i zgodnych pod względem występowania choroby.

Oprócz wielkości grup badanych i wieku osób w grupie kontrolnej czynnikiem zakłócającym, który mógł mieć wpływ na wynik niniejszego badania, była kwalifikacja części osób do grupy kontrolnej na podstawie prawidłowej glikemii na czczo. Dotyczyło to 210 badanych, z których część ma zapewne stan przedcukrzycowy (prediabetes). Jak wykazano w badaniach kohortowych, allel alaniny zwiększa u takich osób ryzyko rozwinięcia się cukrzycy. Jednak, biorąc pod uwagę częstość występowania stanu przedcukrzycowego (w populacji Krakowa 14,52%), wpływ ten jest zapewne marginalny.

Podsumowując ten podrozdział, mimo wymienionych niedoskonałości stosowanych metod badawczych można przypuszczać, że wynik obecnego badania odzwierciedla faktyczny brak związku polimorfizmu Pro12Ala w genie PPAR γ w badanej populacji.

Heterogenność genetyczna może być powodem dużych rozbieżności w wynikach badań związku. Stanowi ona powód, dla którego wymaganie ich replikacji w różnych populacjach dla potwierdzenia wpływu genetycznych wariantów na powstawanie chorób, jest obecnie traktowane mniej restrykcyjnie. Jest to również spowodowane faktem, iż badania związku początkowo dotyczyły mutacji rzadkich, o dużym wpływie na fenotyp, a ich wyniki wykorzystywano w pierwszym rzędzie w poradnictwie genetycznym. Częste polimorfizmy, mające wpływ na występowanie chorób dziedziczonych wielogenowo, mają z reguły niewielki wpływ na fenotyp. W wypadku cukrzycy typu 2 podobne fenotypy mogą być skutkiem różnych konstelacji alleli. Z podobną sytuacją mamy do czynienia w wypadku typów cukrzycy dziedziczonych jednogenowo, spowodowanych mutacjami różnych genów, o niejednokrotnie bardzo zbliżonym obrazie klinicznym. Z kolei w badaniach na zwierzętach udowodniono, że ten sam wariant genu może prowadzić do ujawnienia się różnych cech fenotypowych w zależności od genotypu osobnika, u którego się pojawia. Wylączając gen dla EGFR u myszy różnych szczepów wsobnych, Threadgill i wsp. uzyskali różną długość przeżycia zarodków i różne zmiany ich fenotypu.

8.2 Związek polimorfizmu Gly168Ser genu GLP1R z cukrzycą typu 2

Poszukiwanie związku z cukrzycą typu 2 polimorfizmów w genie receptora glukagonopodobnego peptydu-1 prowadzone było na podstawie jego typowania jako genu-kandydata (vide rozdział 3.4.3 „Potencjalna rola wariantów genetycznych receptora GLP1 [Gly168Ser i Phe260Leu] w patogenezie cukrzycy typu 2 i przedcukrzycowych cech ilościowych”). Warto tu jeszcze raz przypomnieć, że działanie GLP1 u chorych na cukrzycę typu 2, chociaż stosunkowo dobrze zachowane w stosunku do efektu GIP, jest jednak osłabione, co może wskazywać na zaburzenia receptorowe. Niewiele jest dostępnych prac na temat wpływu wariantów genetycznych receptora GLP1 na metabolizm węglowodanów u ludzi. Jak wspomniano we wstępie, opublikowane badania związku z cukrzycą typu 2, oparte na polimorfizmie mikrostelitarnego DNA mogą nie wykrywać słabszych zależności. Myszy z wyłączonymi oboma allelami genu GLP1R (Glp1r $^{-/-}$) rozwijają nietolerancję glukozy podawanej

zarówno doustnie, jak i, co ciekawe, dootrzewnowo, wskutek zmniejszonego wydzielania insuliny .

Stwierdzony w niniejszej pracy związek polimorfizmu Gly168Ser z cukrzycą typu 2 stanowi jedynie przyczynek do dalszych badań nad jego rolą w powstawaniu tej choroby. Dla udowodnienia jego rzeczywistego znaczącego wpływu potrzebne jest potwierdzenie związku w innych populacjach. W weryfikacji zależności pomocne mogą być poszukiwania związku oparte na badaniach rodzin, obciążone mniejszym prawdopodobieństwem wyników fałszywie dodatnich. Występowanie związku wyłącznie u kobiet może być spowodowane różnicami metabolicznymi i hormonalnymi między płciami.

8.3 Związek polimorfizmu Phe260Leu genu GLP1R z cukrzycą typu 2

Nie stwierdzono związku polimorfizmu Phe260Leu genu GLP1R z cukrzycą typu 2. Biorąc pod uwagę możliwą nierównowagę sprzężeń między loci obu badanych w ramach niniejszej pracy wariantów genu GLP1R, można by się spodziewać wynikającego z niej słabszego sygnału związku. Należy jednak także wziąć pod uwagę, iż związek z cukrzycą typu 2 polimorfizmu Gly168Ser nie jest silny (co, jak wspomniano, jest częste w badaniach genetycznego podłoża choroby wielogenowej, której wystąpienie zależy ponadto w sposób znaczny od wpływu środowiska). Można zatem przypuszczać, że ewentualny związek z chorobą polimorfizmu Phe260Leu, wynikający z nierównowagi sprzężeń, okazał się zbyt słaby do wykrycia.

8.4 Związek wybranych polimorfizmów białek receptorowych z przedcukrzycowymi cechami ilościowymi

Do badania przedcukrzycowych cech ilościowych, czyli parametrów wydzielania insuliny i insulinowrażliwości skłania naukowców kilka przyczyn . Jak już wspomniano we wstępie, fenotyp cukrzycy typu 2 stanowi skutek złożonych zaburzeń metabolizmu, z których najważniejszymi są: zmniejszone wydzielanie insuliny i zmniejszona wrażliwość na ten hormon tkanek docelowych (przede wszystkim mięśni szkieletowych, wątroby i tkanki tłuszczowej). Mają one swoje źródło zarówno w podłożu genetycznym, jak i oddziaływaniu środowiska. Możliwe

jest przy tym powstanie na bazie różnych genotypów podobnych fenotypów (co zresztą znajduje odzwierciedlenie w aktualnej definicji i klasyfikacji cukrzycy). Z drugiej strony, zmiana w funkcjonowaniu pojedynczego genu pociąga za sobą najczęściej zaburzenie tylko pewnych szlaków metabolicznych i, w wypadku chorób dziedziczonych wielogenowo, jeśli nie towarzyszą jej inne, sama nie wywołuje choroby (z odwrotną sytuacją mamy do czynienia w schorzeniach monogenowych). Stanowi to przesłankę, aby sądzić, iż łatwiej jest wykryć związek pewnego wariantu z ilościowym zaburzeniem metabolizmu, stanowiącym jeden z elementów patogenezы cukrzycy, niż z chorobą o złożonej przyczynie. Po drugie, w wypadku cukrzycy typu 2 i stanów przedcukrzycowych istnieją dowody na to, że odmienne warunki metaboliczne istniejące u chorych zmieniają funkcję genów, co zaciera obraz zależności, które doprowadziły do jej wystąpienia. Po trzecie w końcu, glikemia i insulinemia, tak na czczo, jak i po obciążeniu glukozą ma w populacji rozkład ciągły. Kategorie normoglikemii, stanów przedcukrzycowych i cukrzycy są ustalane przez zespoły specjalistów arbitralnie, choć w oparciu o badania nad powikłaniami, które te stany wywołują. Badanie różnic pomiędzy nosicielami genotypów w tych podstawowych, mierzonych parametrach, wydaje się zatem odpowiednie także z tego powodu.

8.4.1 Związek polimorfizmu Pro12Ala genu PPAR γ z przedcukrzycowymi cechami ilościowymi

Porównując homozygoty pod względem allelu kodującego prolinę w miejscu 12 łańcucha aminokwasowego PPAR γ z nosicielami allelu alaniny (łącznie hetero- i homozygotycznymi) nie wykazano związku genotypów polimorfizmu Pro12Ala z badanymi przedcukrzycowymi cechami ilościowymi. Jest to wynik w dużej mierze zbieżny z rezultatami opublikowanej niedawno na temat metaanalizy. Objęto nią 57 badań na różnych populacjach (kaukaskich, azjatyckich, Indian amerykańskich i afrykańskiej), dotyczących zarówno osób z prawidłową tolerancją glukozy, jak i stanami przedcukrzycowymi. Porównując genotypy tak, jak w niniejszym badaniu (Pro/Pro z połączonymi Pro/Ala i Ala/Ala), autorzy metaanalizy nie stwierdzili różnic w: insulinemii i glikemii na czczo ani po dwóch godzinach od obciążenia 75g glukozy analizując wspólnie wszystkie wyniki ani w podgrupach wyodrębnionych ze względu na rasę. Wskaźnik masy ciała, jakkolwiek nie różnił się pomiędzy grupami, kiedy analizowano dane ze wszystkich badań, w podgrupie obejmującej osoby rasy kaukaskiej był większy u nosicieli allelu Ala ($p=0,015$). Niestwierdzenie tej zależności w niniejszej pracy (p dla różnicy BMI zbliżone do 1) można tłumaczyć większą siłą statystyczną metaanalizy, jak również istotnymi

różnicami genetycznego podłoża otyłości między populacjami rasy kaukaskiej - kilka dużych badań włączonych do metaanalizy nie wykazało różnic BMI między grupami, np. cytowana już praca autorstwa Frederiksen i wsp. , w innych stwierdzono większy BMI u nosicieli genotypu Pro/Pro; w rezultacie wyniki metaanalizy odznaczały się znaczną niehomogennością. W niniejszej pracy nie dokonano analizy podgrupy z otyłością ze względu na jej niewielką liczebność. Autorzy metaanalizy stwierdzili u osób otyłych większą glikemię na czczo i wyższy wskaźnik HOMA-IR u homozygot Pro/Pro.

Podobnie, ze względu na niewielką liczebność nie porównywano w niniejszej pracy homozygot pod względem allelu kodującego alaninę z homozygotami pod względem allelu proliny. W cytowanej metaanalizie z podobnych przyczyn porównania takiego dokonano jedynie dla wybranych cech ilościowych: glikemii i insulinemii na czczo oraz wskaźnika masy ciała, korzystając z danych zawartych we wszystkich badaniach: u homozygot Ala/Ala istotnie mniejsza była średnia insulinemia na czczo.

8.4.2 Związek polimorfizmów Gly168Ser i Phe260Leu genu GLP1R z przedcukrzycowymi cechami ilościowymi

Stwierdzone w niniejszej pracy związki polimorfizmu Gly168Ser w egzonie 7 genu GLP1R z insulinemią w 120. minucie OGTT, stosunkiem insulinemii w 120. minucie testu do insulinemii na czczo ani wskaźnikiem insulinowrażliwości według Gutt nie były dotychczas opisywane. Wydają się one być spójne z wynikami części badania dotyczącej związku omawianego wariantu z cukrzycą typu 2 (genotyp Ser/Ser częściej występuje u osób chorych). Biorąc pod uwagę fizjologiczną rolę receptora GLP1 (vide rozdział 3.2.1.2. „Rola inkretyn w regulacji wydzielania insuliny” i rozdz. 2.4.3 “Potencjalna rola wariantów genetycznych receptora GLP1 [Gly168Ser i Phe260Leu] w patogenezie cukrzycy i przedcukrzycowych cech ilościowych”) należało się spodziewać, iż przyczyną tego zjawiska jest wpływ polimorfizmu na zmniejszenie wydzielania insuliny przez komórki β wysp trzustkowych. Ta koncepcja wydaje się znajdować potwierdzenie w analizie cech ilościowych. Przy braku różnic między genotypami w insulinemii na czczo, wraz z ilością alleli seryny zmniejsza się insulinemia w 120. minucie OGTT. Stosunek insulinemii po 2 godzinach od obciążenia 75g glukozy do insulinemii na czczo jest przybliżoną miarą wydzielania insuliny przez komórki β wysp trzustkowych . Wykazana zależność może zatem wskazywać na upośledzoną funkcję komórek β trzustki jako na przyczynę stwierdzonego związku polimorfizmu z cukrzycą typu 2.

Różnica między genotypami we wskaźniku insulinowrażliwości według Gutt, opartym na insulinemii i glikemii w doustnym teście tolerancji glukozy (najwyższy dla homozygot Gly/Gly, najniższy dla homozygot Ser/Ser) zależy od różnic glikemii na czczo i po 2 godzinach od obciążenia glukozą. Osiągają one większe wartości u nosicieli allelu seryny (nieistotne statystycznie). Drugi ze wskaźników insulinowrażliwości wykorzystujących wartości glikemii i insulinemii na czczo i po obciążeniu, ISI composite, również jest niższy u tych osób, jakkolwiek różnice nie są istotne statystycznie. Ten fenomen jest trudniejszy do wyjaśnienia na podstawie znanej funkcji receptora GLP1 (wiadomo, że ulega on ekspresji w komórkach β wysp trzustkowych oraz ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie prawdopodobnie wpływa na procesy uczenia się). Rozważając potencjalny wpływ polimorfizmu na insulinowrażliwość należy jednak pamiętać, iż poszczególne wskaźniki zostały obliczone na podstawie tych samych mierzonych zmiennych, nie stanowią zatem parametrów niezależnych. Tak jak w wypadku części badania dotyczącej związku polimorfizmu z cukrzycą typu 2 otrzymane wyniki mogą być traktowane jako punkt wyjścia do dalszych badań.

Nie stwierdzono związku z analizowanymi przedcukrzycowymi cechami ilościowymi wariantów allelicznych polimorfizmu Phe260Leu receptora GLP1. Biorąc pod uwagę negatywne rezultaty badania ich związku z cukrzycą typu 2, wynik ten nie jest zaskoczeniem.

Można by uzyskać dodatkowe informacje dotyczące funkcji wydzielniczej komórek β u osób z poszczególnymi genotypami, mając do dyspozycji dane o glikemii i insulinemii w 30. minucie OGTT, pozwalające obliczyć kolejne wskaźniki wydzielania insuliny, jak: insulinemia w 30. minucie testu, stosunek insulinemii w 30. minucie testu do insulinemii na czczo, stosunek insulinemii do glikemii w 30. minucie OGTT. Obecnie osobom rekrutowanym do badań w Pracowni Genetycznej Katedry Chorób Metabolicznych CMUJ, wykonuje się już oznaczenia tych parametrów, jednak ilość wyników była zbyt mała, aby włączyć je do obliczeń.

W ramach poszukiwania związków między wariantami genów białek receptorowych a przedcukrzycowymi cechami ilościowymi dokonano licznych porównań. W tej sytuacji niektórzy badacze zalecają stosowanie poprawek na wielokrotne porównania, zmniejszających prawdopodobieństwo popełnienia błędu drugiego rodzaju. Zastosowanie ich spowodowałoby utratę znamienności znalezionych zależności. Ponieważ jednak, jak wspomniano we wstępie (vide rozdział 3.4.1., „Przegląd wyników dotychczasowych badań genetycznego podłoża cukrzycy typu 2”) spodziewane zależności między pojedynczym wariantem genu a chorobą o wielogenowym podłożu są słabe można poprawki te pominąć, mając świadomość, że wyniki badania związku wymagają dalszego potwierdzenia innymi metodami.

8.5 Mutacja Pro115Gln genu PPAR γ a otyłość w badanej populacji

Jak wspomniano we wstępie, mutacja Pro115Gln w badaniach wielu populacji okazała się być rzadką przyczyną otyłości. Autorzy pierwszego doniesienia na jej temat, poszukując wariantów genetycznych wiodących do zmian podatności seryny w miejscu 114 łańcucha aminokwasowego na fosforylację, wykryli ją, sekwencjonując DNA 32 otyłych osób zamieszkałych w regionie Nadrenii – Westfalii w Niemczech, u jednej z nich. Następnie stosując metodę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), do której analogiczną posłużono się w niniejszej pracy, stwierdzili, iż jeszcze troje z 358 badanych było heterozygotami Pro/Gln. BMI nosicieli mutacji było większe, niż pozosaley osób otyłych i wynosiło od 37,9 do 47,3 kg/m² zaś insulinemia na czczo – mniejsza, co sugerowało większą insulinowrażliwość. Troje z nich chorowało również na cukrzycę typu 2.

Autorzy cytowanej publikacji przeprowadzili również badania czynnościowe zmutowanego białka: dokonali transfekcji retrowirusowej fibroblastów NIH 3T3 i udowodnili brak fosforylacji syntetyzowanych cząsteczek zawierających glutaminę w pozycji 115 oraz zwiększoną akumulację trójglicerydów w komórkach, w których dochodziło do ekspresji zmutowanego genu.

Kiedy podjęte zostały poszukiwania w innych populacjach, mutacja okazała się być znacznie rzadsza, niż wynikało to z oryginalnego doniesienia. Nie stwierdzono jej u żadnego z 1069 badanych (w tym 626 otyłych) z populacji francuskiej, 590 mieszkańców Tajwanu, 1621 mężczyzn z populacji duńskiej (w tym 752 otyłych o BMI większym lub równym 31kg/m²), 983 osób z kilku populacji amerykańskich należących do różnych grup etnicznych (Amerykanie pochodzenia kaukaskiego: ze stanu Maryland, Missisipi, Pensylwanii i Karoliny Północnej; pochodzenia Afrykańskiego; Indianie Pima).

Również w kolejnych badaniach w populacjach niemieckich nie wykryto nowych nosicieli allelu kodującego glutaminę w pozycji 115 łańcucha aminokwasowego PPAR γ : u 296 otyłych dzieci i osób młodych ani wśród stutrzydziestoosobowej grupy kontrolnej, 359 osób z otyłością różnego stopnia, 365 chorych na cukrzycę typu 2. Dokonano genotypowania pod względem mutacji wszystkich chorych otyłych o BMI większym lub równym 35 kg/m², biorących udział w niemieckim narodowym badaniu epidemiologicznym, nie stwierdzając jej u żadnego z badanych. Niespełna rok po opublikowaniu tej pracy ta sama grupa badaczy wykryła

mutację u chorego otyłego z nietolerancją glukozy i bardzo znaczną insulinoopornością . Jest to szczególnie ciekawe w kontekście zachowanej insulinooporności u pozostałych jej nosicieli.

Genotypowanie mutacji Pro115Gln genu PPAR γ prowadzono również w Polsce. Nie stwierdzono jej u żadnego z 122 członków 40 rodzin z Polski południowej obciążonych rodzinną otyłością, ani z 220 osób z regionu Dolnego Śląska (w tym 126 otyłych) .

Badania podjęte w ramach prezentowanej pracy nie doprowadziły do wykrycia nowych przypadków. Ponieważ wszyscy nosiciele allelu kodującego glutaminę cechowali się znaczną otyłością, genotypowanie ograniczono do osób o BMI większym lub równym 35 kg/m². Według oceny autorów wielu cytowanych powyżej doniesień na temat tej mutacji, w tym późniejszej pracy współautorstwa jednego z autorów oryginalnego raportu , może ona być charakterystyczna dla lokalnej populacji, a jej znaczenie epidemiologiczne jako przyczyny otyłości jest niewielkie. Znaczenie mutacji, podobnie jak innych rzadkich wariantów genetycznych, polega na potencjalnie dużym wpływie na metabolizm jej nosicieli, jak również na informacji o funkcjonowaniu PPAR γ , której dostarczają ich badania. Stanowi ona rzadki przykład mutacji wiodącej do zwiększenia aktywności białka. W tym kontekście rozbieżne obserwacje na temat insulinooporności nielicznych zidentyfikowanych dotychczas nosicieli allelu kodującego glutaminę, skłaniają do poszukiwania kolejnych. Jak wynika z dotychczasowych badań, powinny one obejmować w pierwszym rzędzie chorych ze znaczną otyłością.

9 WNIOSKI

1. W badaniu kliniczno – kontrolnym, dotyczącym związku polimorfizmu Pro12Ala genu receptora aktywowanego proliferatorami peroksosomów – γ (PPAR γ) z cukrzycą typu 2 stwierdzono częstość występowania genotypów odpowiednio: Pro/Pro – 70,1%, Pro/Ala – 27,7%, Ala/Ala – 2,2% oraz Pro/Pro - 71,5%; Pro/Ala - 25,2%; Ala/Ala - 3,3%. Rozkład genotypów w obu grupach nie różnił się. Nie potwierdzono opisywanego w innych populacjach związku polimorfizmu Pro12Ala w genie PPAR γ z cukrzycą typu 2.
2. Istnieje nieopisywany wcześniej związek polimorfizmu Gly168Ser genu GLP1R z cukrzycą typu 2, stwierdzony na podstawie różnicy częstości występowania genotypów w grupie chorych na cukrzycę typu 2 i w grupie kontrolnej. Za znamienność odpowiada różnica częstości występowania polimorfizmu między kobietami z grupy badanej i kontrolnej, ponieważ częstość jego występowania u mężczyzn z obu grup nie różniła się istotnie. Wariantem związanym ze zwiększonym ryzykiem zachorowania jest allel seryny.
3. Stwierdzono następujący rozkład genotypów polimorfizmu Phe260Leu genu GLP1R: w grupie chorych na cukrzycę typu 2: Phe/Phe – 35,7%, Phe/Leu – 46,6%, Leu/Leu – 17,7%, w grupie kontrolnej odpowiednio 32,5%; 49,9%; 17,6%. Częstość występowania genotypów w obu grupach nie różniła się istotnie.
4. Nie stwierdzono związku genotypów polimorfizmu Pro12Ala w genie PPAR γ z żadną z analizowanych ilościowych miar wydzielania insuliny, insulinowrażliwości ani otyłości.
5. Nosiciele allelu kodującego serynę w pozycji 168 łańcucha aminokwasowego GLP1R wykazują zmniejszone wydzielanie insuliny oraz mniejszą wrażliwość na insulinę, najsilniej wyrażone u homozygot.
6. Nie stwierdzono związku genotypów polimorfizmu Phe260Leu genu GLP1R z żadną z analizowanych ilościowych miar wydzielania insuliny, insulinowrażliwości ani otyłości.
7. U żadnej z osób o wskaźniku masy ciała większym lub równym 35 kg/m² z grupy chorych na cukrzycę typu 2 i grupy kontrolnej badania kliniczno – kontrolnego nie wykryto mutacji Pro115Gln genu PPAR γ .

10 STRESZCZENIE

Wstęp:

Cukrzyca typu 2 stanowi współcześnie istotną przyczynę chorobowości i śmiertelności w społeczeństwach krajów rozwiniętych. Obok przyczyn środowiskowych, takich jak nieprawidłowe żywienie, siedzący tryb życia, otyłość o jej wystąpieniu decydują czynniki genetyczne. Świadczą o tym: zwiększone ryzyko zachorowania u krewnych chorych na cukrzycę typu 2, duża zgodność występowania choroby u bliźniąt – większa u bliźniąt jednojajowych niż dwujajowych oraz różna chorobowość w różnych grupach etnicznych. Ostatnio notuje się znaczny postęp w identyfikacji odpowiedzialnych wariantów genetycznych. Dotyczy on jednak głównie przypadków choroby dziedziczonych monogenowo, zaliczanych wcześniej do cukrzycy typu 2, zaś po odkryciu patogenetycznych mutacji do innych określonych typów cukrzycy. Genetyczne tło tzw. złożonych form cukrzycy typu 2 (wg podziału WHO nazywanych po prostu cukrzycą typu 2) jest poznane słabiej z kilku powodów: dużego udziału w jej patogenezie czynników środowiskowych, późnego czasu ujawniania się, heterogenności genetycznej, czyli faktu, że różne konstelacje wariantów genetycznych dają zbliżony fenotyp choroby, w końcu niewielkiego wpływu poszczególnych polimorfizmów na ryzyko zachorowania. Do wykrywania takich zależności stosowane są m. in. kliniczno – kontrolne badania związku (*case-control association studies*). Ich zaletą jest stosunkowo duża czułość, a wadą – częsty brak powtarzalności. W związku z tym obok prac mających na celu identyfikację nowych wariantów genetycznych wpływających na zachorowanie dokonuje się tą metodą prób weryfikacji wcześniej opisanych zależności w różnych populacjach. Dodatkową metodą badania podłoża genetycznego cukrzycy typu 2 jest ocena związku wariantów genetycznych z ilościowymi parametrami oceniającymi wydzielanie insuliny i wrażliwość tkanek obwodowych na ten hormon, zwanych przedcukrzycowymi cechami ilościowymi.

Cel pracy:

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie związku między wybranymi polimorfizmami w białkach receptorowych a cukrzycą typu 2 i przedcukrzycowymi cechami ilościowymi. Do badania wybrano polimorfizmy: Pro12Ala w genie PPAR γ , którego związek z cukrzycą stwierdzono w wielu populacjach oraz Gly168Ser i Phe260Leu w genie GLP1R, wybranym jako

gen – kandydat, związany z regulacją wydzielania insuliny przez komórki β wysp trzustkowych. Związek wymienionych wariantów aminokwasowych genu GLP1R z cukrzycą typu 2 ani przedcukrzycowymi cechami ilościowymi nie był dotychczas oceniany. Ponadto dokonano oceny częstości występowania wśród osób otyłych w badanej populacji mutacji Pro115Gln w genie PPAR γ , mogącej stanowić podłoże monogenowej formy otyłości.

Materiał i Metody:

Badaniem kliniczno – kontrolnym objęto 462 niespokrewnionych chorych na cukrzycę typu 2 i 428 niechorujących osób, stanowiących grupę kontrolną. U części badanych z grupy kontrolnej (218 osób) prawidłowy metabolizm glukozy zweryfikowano doustnym testem tolerancji glukozy wg WHO (OGTT), pozostali zostali włączeni na podstawie prawidłowej glikemii na czczo i braku hiperglikemii w wywiadzie. Osoby biorące udział w badaniu wypełniały standardowy kwestionariusz dotyczący wywiadu odnośnie do cukrzycy typu 2, innych chorób, aktualnego leczenia, nałogu palenia, występowania cukrzycy w rodzinie. Wykonywano u nich pomiary wzrostu i wagi oraz pobierano krew do badań biochemicznych i genetycznych. U wszystkich przeprowadzono genotypowanie w zakresie wybranych polimorfizmów w genach: PPAR γ (Pro12Ala) i GLP1R (Gly168Ser i Phe260Leu). U osób z grupy kontrolnej, u których wykonano OGTT, obliczono na podstawie insulinemii i glikemii na czczo i w 120. minucie testu ilościowe wskaźniki wydzielania insuliny i insulinowrażliwości. Dodatkowo u osób z otyłością o wskaźniku masy ciała większym lub równym 35 dokonano genotypowania mutacji Pro115Gln w genie PPAR γ .

Wyniki:

Genotypy polimorfizmu Pro12Ala genu PPAR γ występowały wśród chorych na cukrzycę typu 2 z częstością Pro/Pro – 70,1%, Pro/Ala – 27,7%, Ala/Ala – 2,2%, w grupie kontrolnej odpowiednio 71,5%; 25,2%; 3,3%. Różnice nie były istotne statystycznie ($p=0,67$). Częstość występowania genotypów polimorfizmu Gly168Ser genu GLP1R wynosiła w grupie chorych na cukrzycę typu 2: Gly/Gly – 40%, Gly/Ser – 43,9%, Ser/Ser – 16,1%, w grupie kontrolnej odpowiednio 45,2%; 47,3%; 7,5% ($p=0,027$). W modelu recesywnego efektu allelu seryny iloraz ryzyka zachorowania na cukrzycę typu 2 dla homozygot Ser/Ser w porównaniu do homozygot Gly/Gly wyniósł 2,6 (95%CI - 1,32-5,2). Analiza stratyfikacyjna wykazała, iż za znamienność odpowiada różnica częstości występowania genotypów u kobiet ($p=0,012$); u mężczyzn nie była ona istotna statystycznie ($p=0,82$). Częstość występowania genotypów polimorfizmu Phe260Leu genu GLP1R wynosiła w grupie chorych na cukrzycę: Phe/Phe – 35,7%, Phe/Leu – 46,6%, Leu/Leu – 17,7%, w grupie kontrolnej odpowiednio 32,5%; 49,9%;

17,6%. Różnice nie były istotne statystycznie. Wśród osób z grupy kontrolnej, u których wykonano OGTT, stwierdzono u nosicieli różnych genotypów polimorfizmu Gly168Ser genu GLP1R znamienne różną insulinemię w 120. minucie testu (Gly/Gly - 36,61 μ IU/ml, Gly/Ser - 31,51 μ IU/ml, Ser/Ser - 26,80 μ IU/ml; $p=0,019$), stosunek insulinemii w 120. minucie testu do insulinemii na czczo (Gly/Gly - 3,48, Gly/Ser - 3,03, Ser/Ser - 2,78; $p=0,0229$) oraz wskaźnik insulinowrażliwości według Gutt (Gly/Gly - 135,37, Gly/Ser - 125,74, Ser/Ser - 117,16; $p=0,0338$). Nie zanotowano różnic wskaźników wydzielania insuliny ani insulinowrażliwości między genotypami pozostałych polimorfizmów. Wszystkie osoby przebadane pod kątem polimorfizmu Pro115Gln genu PPAR γ były homozygotycznymi nosicielami allelu proliny.

Wnioski:

Nie potwierdzono opisywanego w innych populacjach związku polimorfizmu Pro12Ala w genie PPAR γ z cukrzycą typu 2. Istnieje nieopisywany wcześniej związek polimorfizmu Gly168Ser genu GLP1R z cukrzycą typu 2, stwierdzony na podstawie różnicy częstości występowania genotypów w grupie chorych na cukrzycę typu 2 i grupie kontrolnej. Za znamienność odpowiada różnica częstości występowania polimorfizmu między kobietami z grupy badanej i kontrolnej, ponieważ częstość jego występowania u mężczyzn z obu grup nie różniła się istotnie. Wariantem związanym ze zwiększonym ryzykiem zachorowania był allel seryny. Częstość występowania genotypów polimorfizmu Phe260Leu genu GLP1R nie różniła się między grupami: badaną i kontrolną. Nie stwierdzono związku genotypów polimorfizmu Pro12Ala w genie PPAR γ z żadną z analizowanych ilościowych miar wydzielania insuliny, insulinowrażliwości ani otyłości. U nosicieli allelu kodującego serynę w pozycji 168 łańcucha aminokwasowego GLP1R wykazano zmniejszone wydzielanie insuliny oraz mniejszą wrażliwość na insulinę, najsilniej wyrażone u homozygot. Nie stwierdzono związku genotypów polimorfizmu Phe260Leu genu GLP1R z żadną z analizowanych ilościowych miar wydzielania insuliny, insulinowrażliwości ani otyłości. U żadnej z osób o wskaźniku masy ciała większym lub równym 35kg/m² z grupy chorych na cukrzycę typu 2 i grupy kontrolnej badania kliniczno – kontrolnego nie wykryto mutacji Pro115Gln genu PPAR γ .

11 SUMMARY

Introduction:

Type 2 diabetes is one of the most common metabolic disorders. The number of diabetes patients worldwide has reached 171 million in 2000 and is estimated to rise to 366 million by 2030. Besides environmental factors, like excessive calories intake, sedentary lifestyle and obesity, genetic background plays a role in the pathogenesis of the disease. Familial clustering of type 2 diabetes, higher concordance rates for the disease in monozygotic versus dizygotic twins and its various prevalence in different populations are some of the pieces of evidence for this. Lately, considerable progress could be noted in identifying causative variants. However until now it has been made for the most part in research on rare monogenic forms of disease, which had been previously numbered among cases of type 2 diabetes and now, after their underlying mutations were found, are classified as other specific types of diabetes. Genetic background of common, so-called complex forms of type 2 diabetes (per WHO classification – type 2 diabetes) is less known. There are several issues accounting for that: considerable influence of environmental factors on the development of the disease, its late onset in life, genetic heterogeneity (the fact that various sets of polymorphisms can lead to very similar phenotypes) and little contribution of single variants to the overall risk of developing the condition. Case-control association studies are a widely used tool to search for those relations. Their advantage is high sensitivity but they often lack reproducibility. This induces the necessity of verifying the role of individual variants in various populations in addition to searching for new associations. Assessment of associations of genetic variants with quantitative measures of insulin secretion and sensitivity, referred to as prediabetic quantitative traits, constitutes another tool for investigating into genetic background of type 2 diabetes.

Aim of the study:

The aim of this study was to investigate the role of selected polymorphisms of receptor proteins in the pathogenesis of type 2 diabetes, prediabetic quantitative traits and obesity in a Polish population. Three polymorphisms have been chosen. A Pro12Ala variant in PPAR γ gene, association of which with type 2 diabetes has been described in many populations, and two polymorphisms in GLP1 receptor gene, chosen as a candidate gene, encoding an incretin receptor playing a role in insulin secretion by pancreatic beta cells - Gly168Ser and Phe260Leu.

There are, to our knowledge, no case-control association studies published on their role in the pathogenesis of this disease. Moreover the occurrence of a mutation Pro115Gln in PPAR γ among obese subjects with BMI ≥ 35 has been assessed.

Materials and methods:

Case – control study on 462 nonrelated type 2 diabetes patients and a control group of 428 nondiabetic subjects was performed. In a part of the control group, comprising 218 subjects, normal glucose metabolism was verified by oral glucose tolerance test. The remaining part was included based on normal fasting glucose and no history of previous hyperglycaemia. All subjects were asked to fill in questionnaires on history of type 2 diabetes and concomitant diseases, medication taken, tobacco smoking, familial history of diabetes. Their weight and height were measured and blood was drawn for biochemical and genetic analyses. In patients from control group who had undergone OGTT insulin secretion and sensitivity measures were calculated, based on fasting and 120-minute postload glycemia and insulinemia. In all subjects genotypes of the polymorphisms in the PPAR γ (Pro12Ala) and the GLP1R (Gly168Ser and Phe260Leu) genes were ascertained. Obese patients with BMI ≥ 35 were genotyped for the Pro115Gln mutation in the PPAR γ gene.

Results:

Following genotype frequencies of the PPAR γ Pro12Ala polymorphism have been recorded: in type 2 diabetes group: Pro/Pro – 70,1%; Pro/Ala – 27,7%; Ala/Ala – 2,2%, and in control group 71,5%; 25,2% and 3,3%, respectively. Differences were not statistically significant ($p=0,67$). Genotype distribution of the GLP1R Gly168Ser polymorphism in cases was as follows: in type 2 diabetes group: Gly/Gly – 40%; Gly/Ser – 43,9%; Ser/Ser – 16% and in control group 45,2%; 47,3% and 7,5% respectively ($p=0,027$). Applying a model of recessive effect of the serine allele yielded risk ratio of developing type 2 diabetes for serine allele homozygotes of 2,6 (95% CI – 1,32 – 5,2). Stratification analysis showed that the significance was dependent on the difference between genotype frequencies in women from both groups ($p=0,012$). The difference between men was insignificant ($p=0,82$). Following genotype frequencies of the GLP1R Phe260Leu polymorphism were observed: in type 2 diabetes group: Phe/Phe – 35,7%, Phe/Leu – 46,6% and Leu/Leu – 17,7%; in the control group 32,5%, 49,9% and 17,6% respectively. The differences were not statistically significant. Among the controls in whom OGTT had been performed significant differences were found between carriers of different genotypes of the GLP1R Gly168Ser polymorphism in 120-minute postload insulinemia, 120-minute postload insulinemia to fasting insulinemia ratio and Gutt insulin

sensitivity index. The average values of 120-minute postload insulinemia were: in homozygotes for the glycine allele 36,61 μ IU/ml, in heterozygotes 31,51 μ IU/ml and in serine allele homozygotes 26,80 μ IU/ml ($p=0,019$). Those of 120-minute postload to fasting insulinemia ratio were 3,48; 3,03 and 2,78 ($p=0,0229$) and of Gutt insulin sensitivity index – 135,37; 125,74 and 117,16, respectively. There were no significant differences detected in insulin secretion or sensitivity indices between various genotype carriers of the remaining polymorphisms studied. All subjects screened for the PPAR γ Pro115Gln mutation were homozygous for the wild-type Pro allele.

Conclusion:

The association of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR γ gene with type 2 diabetes has not been reproduced in this study. There has been an association found of the GLP1R gene Gly168Ser polymorphism with type 2 diabetes, which has not been previously described. It was dependent on genotype occurrences difference between women from type 2 diabetes and control group. The genotype occurrences in men from both groups did not differ significantly. The serine allele proved to confer increased risk of type 2 diabetes. No differences in genotype occurrences of the GLP1R gene Phe260Leu polymorphism between type 2 diabetes and control group were noted. There were no differences in insulin secretion and sensitivity measures or BMI between carriers of different genotypes of the PPAR γ Pro12Ala polymorphism. Carriers of the serine-encoding allele in the position 168 of the GLP1R gene tended to have lower insulin secretion capacity as well as lower insulin sensitivity. No difference was noted between carriers of different genotypes of the GLP1R Phe260Leu polymorphism in any of insulin secretion or sensitivity measures investigated. All subjects genotyped for the mutation Pro115Gln proved to be homozygotes of the proline allele.

12 PIŚMIENNICTWO

Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych

ul. Kopernika 15
31-501 Kraków
tel. 421-39-72 lub 421-37-94

ANKIETA GENETYCZNA

Typ 2 cukrzycy

DATA ANKIETY:.....

IMIĘ I NAZWISKO:.....

Adres:.....

Numer telefonu:.....

Wywiad chorobowy: Prosimy o zastanowienie się nad odpowiedziami i umieszczenie ich we właściwych rubrykach.

1. **Rok** rozpoznania cukrzycy:.....Ile Pan/Pani miał(a) wtedy **lat**.....

2. Aktualna metoda leczenia (podkreślić właściwe):

Bez leczenia

Dieta

Leki doustne

Insulina

JEŻELI STOSOWANA JEST INSULINA, to w **ile lat po rozpoznaniu cukrzycy** zaczęto ją stosować?..... **Jaki to był rok?**.....

JEŻELI STOSOWANA JEST INSULINA, to jaka jest jej **dobowa dawka?**.....

3. Prosimy o podanie swojej **daty urodzenia** Dzień.....Miesiąc.....Rok.....

4. Prosimy o podanie swojego **wzrostu**:.....cm

5. Prosimy o podanie swojej **wagi**:.....kg

6. Jaka była Pan/Pani **największa waga w życiu** i kiedy to miało miejsce?

Waga.....kg **Wiek**.....

W pytaniach zamieszczony poniżej prosimy w odpowiednich miejscach o podkreślenie prawidłowej odpowiedzi TAK lub NIE

7. Czy Pan/Pani lekarz powiedział kiedykolwiek, że ma Pan/Pani wysokie ciśnienie tętnicze lub nadciśnienie?

NIE TAK

JEŻELI TAK, czy aktualnie stosuje Pan/Pani leki obniżające ciśnienie tętnicze krwi ?

NIE TAK

JEŻELI TAK, to prosimy wymienić te leki:.....

.....
8. Czy lekarz powiedział Panu/Pani kiedykolwiek, że miał/a Pan/Pani atak serca lub dusznicę bolesną?

NIE TAK

JEŻELI TAK, to prosimy podać datę.....

9. Czy był/a Pan/Pani kiedykolwiek hospitalizowany(a) z powodu zawału serca

NIE TAK

JEŻELI TAK, to prosimy podać datę/y hospitalizacji:.....

10. Czy lekarz kiedy powiedział Panu/Pani, że ma Pan/Pani **chorobę nerek (nefropatię)** związaną z cukrzycą?

NIE TAK

JEŻELI TAK, prosimy podać kiedy to miało miejsce.....

11. Czy lekarz powiedział Panu/Pani kiedykolwiek, że ma Pan/Pani **retinopatię** lub inne problemy oczne związane z cukrzycą?

NIE TAK

JEŻELI TAK, prosimy podać kiedy to miało miejsce.....

Czy miał Pan/Pani kiedykolwiek wykonywany zabieg laseroterapii?

NIE

TAK

12. Czy był/a Pan/Pani kiedykolwiek leczony z powodu innej choroby?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, prosimy o ich wymienienie.....

.....

WYWIAD RODZINNY

Prosimy o odpowiedź na poniższe pytania dotyczące problemów zdrowotnych Pani/Pana rodziny. Wszystkie pytania dotyczą rodzin biologicznych (nie dotyczą rodzeństwa przybranego, dzieci adoptowanych).

RODZEŃSTWO

Czy ma Pan/Pani braci lub siostry?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy o ich wymienienie począwszy od najstarszych:

1. Rok urodzeniapleć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE

TAK

Czy żyje

NIE

TAK

2. Rok urodzeniapleć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE

TAK

Czy żyje

NIE

TAK

3. Rok urodzeniapleć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE

TAK

Czy żyje

NIE

TAK

4. Rok urodzeniapleć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE

TAK

Czy żyje

NIE

TAK

5. Rok urodzeniapleć.....

Czy miało miejsce rozpoznanie cukrzycy?

NIE

TAK

Czy żyje

NIE

TAK

DZIECI

Czy ma Pani/Pan dzieci?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to u któregoś z nich wystąpiła cukrzyca.....

POZOSTAŁA RODZINA:

Czy ktoś inny (poza rodzeństwem i dziećmi) w Pani/Pana rodzinie chorował lub choruje na cukrzycę:

.....

.....

.....

.....

PALENIE TYTONIU

1. Czy palił Pan/Pani kiedykolwiek papierosy?

NIE

TAK

JEŻELI NIE, to prosimy o pominięcie pozostałych pytań.

JEŻELI TAK, to w jakim wieku zaczął/a Pan/Pani palić regularnie?

Wiek.....

2. Czy aktualnie pali Pan/Pani papierosy?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy o przejście do pytania 3.

JEŻELI NIE, to w jakim wieku rzucił/a Pan/Pani palenie? Wiek.....

3. Ile średnio paczek papierosów wypalał/a Pan/Pani dziennie w czasie ostatniego miesiąca palenia papierosów?.....

Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych

ul. Kopernika 15,
31-501 Kraków
tel. 421-39-72 lub 421-37-94

ANKIETA GENETYCZNA

Kontrola

DATA ANKIETY:.....

IMIĘ I NAZWISKO:.....

Adres:.....

Numer telefonu:.....

Wywiad chorobowy: Prosimy o zastanowienie się nad odpowiedziami i umieszczenie ich we właściwych rubrykach. W odpowiednich miejscach prosimy podkreślić odpowiedź TAK lub NIE.

1. Czy miała Pan/Pani kiedykolwiek stwierdzoną nieprawidłową wartość glukozy we krwi?

NIE

TAK

Jeżeli TAK, prosimy o opuszczenie dalszej części ankiety

Jeżeli NIE, to ile kiedy ostatni raz zmierzono Pani/Panu poziom glukozy, czy było to na czczo, czy po posiłku oraz ile ta wartość

wynosiła:.....

2. Prosimy o podanie swojej **daty urodzenia?** Dzień.....Miesiąc.....Rok.....

7. Prosimy o podanie swojego **wzrostu:**.....cm

8.

9. Prosimy o podanie swojej **wagi:**.....kg

10.

11. Jaka była Pani/Pana **największa waga w życiu** i kiedy to miało miejsce?

Waga.....kg **Wiek**.....

6. Czy Pani/Pana lekarz powiedział kiedykolwiek, że ma Pani/Pan wysokie ciśnienie tętnicze lub nadciśnienie (właściwe zakreślić)?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, czy aktualnie stosuje Pani/Pan leki obniżające ciśnienie tętnicze krwi (właściwe zakreślić)?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy wymienić te leki:.....

7. Czy lekarz powiedział Pani/Panu kiedykolwiek, że miał/a Pani/Pan chorobę niedokrwinną serca, atak serca lub dusznicę bolesną?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy podać datę.....

8. Czy był/a Pan/Pani kiedykolwiek hospitalizowana z powodu zawału serca?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy podać datę/y hospitalizacji:.....

9. Czy stosuje Pan/Pani leki obniżające cholesterol?

JEŻELI TAK, to prosimy jakie:.....

NIE

TAK

WYWIAD RODZINNY

Czy ktoś z Pani/Pana rodziny choruje lub chorował na cukrzycę, w jakim wieku zachorował i jak jest

aktualnie
leczony:.....

.....

PALENIE TYTONIU

2. Czy palił Pani/Pan kiedykolwiek papierosy?

NIE

TAK

JEŻELI NIE, to prosimy o pominięcie pozostałych pytań.

JEŻELI TAK, to w jakim wieku zaczął/a Pani/Pan palić regularnie?

Wiek.....

2. Czy aktualnie pali Pani/Pan papierosy?

NIE

TAK

JEŻELI TAK, to prosimy o przejście do pytania 3.

JEŻELI NIE, to w jakim wieku rzucił/a Pani/Pan palenie? Wiek.....

3. Ile średnio paczek papierosów wypalał/a Pani/Pan dziennie w czasie ostatniego miesiąca palenia papierosów?.....