



MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

ÚSTAV BIOCHEMIE



ADIPOCYTOKINY A VYBRANÁ ZÁNĚTLIVÁ ONEMOCNĚNÍ: STUDIE KONTROL A PŘÍPADŮ

Diplomová práce

Bc. Július Jánoš

Vedoucí práce:

Mgr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D.

Brno 2018

Bibliografický záznam

Autor:	Bc. Július Jánoš Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav Biochemie
Název práce:	Adipocytokiny a vybraná zánětlivá onemocnění: studie kontrol a případů
Studijní program:	Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Vedoucí práce:	Mgr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D.
Akademický rok:	2017/2018
Počet stran:	61
Klíčová slova:	Adipocytokiny, gastroezofageální refluxní choroba, astma, diabetes mellitus, parodontitida, genový polymorfismus, studie kontrol a případů

Bibliografický záznam

Autor:	Bc. Július Jánoš Prírodovedecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav Biochémie
Názov práce:	Adipocytokíny a vybrané zápalové ochorenia: štúdia kontrol a prípadov
Študijný program:	Biochémia
Študijný obor:	Biochémia
Vedúci práce:	Mgr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D.
Akademický rok:	2017/2018
Počet strán:	61
Kľúčové slová:	Adipocytokíny, gastroezofageálna refluxná choroba, astma, diabetes mellitus, parodontitída, génový polymorfizmus, štúdia kontrol a prípadov

Bibliographic Entry

Author: Bc. Július Jánoš
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Biochemistry

Title of Thesis: Adipocytokines and selected inflammatory diseases: a case-control study

Degree programme: Biochemistry

Field of Study: Biochemistry

Supervisor: Mgr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D.

Academic Year: 2017/2018

Number of Pages: 61

Keywords: Adipocytokines, gastroesophageal reflux disease, asthma, diabetes mellitus, periodontitis, gene polymorphism, case-control study

Abstrakt

Společným rysem multifaktoriálních chorob jako je refluxní ezofagitida (patřící do skupiny gastroezofageální refluxní choroby, GERD), astma, diabetes mellitus 2. typu (T2DM), chronická parodontitida (CP) a obezita, je přítomnost low-grade zánětlivého stavu. Role adipocytokinů v patogenezi těchto onemocnění je v současnosti intenzivně studována. Prvním cílem této práce bylo zpracovat literární rešerši zaměřenou na adipocytokiny a jejich vztah k vybraným zánětlivým chorobám. Druhým cílem bylo v rámci asociační studie kontrol a případů determinovat varianty v genech pro adipocytokiny a korelovat získaná data s klinickými a biochemickými parametry.

Na základě rešerše bylo vybráno 6 polymorfizmů v genech *ADIPOQ*, *LEP*, *LEPR* a *RETN*, které byly stanoveny pomocí PCR metod u kontrol a pacientů ve třech oddělených studiích zaměřených na GERD, ASTMA, nebo T2DM a CP. Kromě toho byly u podskupiny osob ve studii ASTMA měřeny koncentrace adiponektinu a u T2DM a CP byly měřeny koncentrace adiponektinu, leptinu a resistinu v plazmě. Zatímco nebyl nalezen žádný rozdíl v alelických ani genotypových frekvencích mezi kontrolami a pacienty s GERD, ve studii ASTMA byl asociovaný polymorfizmus rs1501299 v genu *ADIPOQ* se zkoumaným onemocněním a ve studii T2DM a CP se ten samý polymorfizmus jeví jako možný protektivní marker pro CP ($P < 0,01$). Pilotní výsledky naznačují, že variabilita v genu kódujícím adiponektin se může podílet na patogenezi onemocnění astma a CP.

Abstrakt

Spoločným rysom multifaktoriálnych ochorení ako je refluxná ezofagitída (patriaca do skupiny gastroezofageálnej refluxnej choroby, GERD), astma, diabetes mellitus 2. typu (T2DM), chronická parodontitída (CP) a obezita, je prítomnosť low-grade zápalového stavu. Rola adipocytokínov v patogenéze týchto ochorení je v súčasnosti intenzívne študovaná. Prvým cieľom tejto práce bolo spracovať literárnu rešerš zameranú na adipocytokíny a ich vzťah k vybraným zápalovým ochoreniam. Druhým cieľom bolo v rámci asociačnej štúdie kontrol a prípadov determinovať varianty v génoch pre adipocytokíny a korelovať získané dáta s klinickými a biochemickými parametrami.

Na základe rešerše bolo vybraných 6 polymorfizmov v génoch *ADIPOQ*, *LEP*, *LEPR* a *RETN*, ktoré boli stanovené pomocou PCR metód u kontrol a pacientov v troch oddelených štúdiách zameraných na GERD, ASTMA, alebo T2DM a CP. Okrem toho

boli u podskupiny osôb v štúdiu ASTMA merané koncentrácie adiponetínu a u T2DM a CP boli merané koncentrácie adiponektínu, leptínu a rezistínu v plazme. Zatiaľ čo nebol objavený žiadny rozdiel v alelických ani genotypových frekvenciách medzi kontrolami a pacientami s GERD, v štúdiu ASTMA bol asociovaný polymorfizmus rs1501299 v géne *ADIPOQ* so skúmaným ochorením a v štúdiu T2DM a CP sa ten istý polymorfizmus javí ako možný protektívny marker pre CP ($P < 0,01$). Pilotné výsledky naznačujú, že variabilita v géne kódujúcom adiponektín sa môže podieľať na patogenéze ochorení astma a CP.

Abstract

A common feature of multifactorial diseases, such as reflux esophagitis (belonging to gastroesophageal reflux disease, GERD), asthma, type 2. diabetes mellitus (T2DM), chronic periodontitis (CP) and obesity, is presence of a low-grade inflammatory condition. The role of adipocytokines in the pathogenesis of these diseases is being intensively studied. The first aim of this work was to process literary research focused on adipocytokines and their relation to selected chronic inflammatory diseases. The second objective was to determine variants in adipocytokine genes in a case-control study and to correlate the obtained data with clinical and biochemical parameters.

Altogether, 6 polymorphisms in genes *ADIPOQ*, *LEP*, *LEPR* and *RETN* have been selected, based on the research. Using PCR methods in controls and patients in three separate studies focused on GERD, ASTHMA, or T2DM and CP, selected polymorphisms have been genotyped. In addition, in subgroup of people in study ASTHMA adiponectin plasma concentrations, and in study T2DM and CP, plasma concentrations of adiponectin, leptin and resistin have been measured. Although no difference in allele or genotype frequencies between controls and cases with GERD has been found, in ASTHMA study, polymorphism rs1501299 in *ADIPOQ* gene was associated with disease, and in T2DM and CP study, the same variant appears as a possible protective marker for CP ($P < 0,01$). Pilot results indicate, that variability in gene encoding adiponectin might play a role in pathogenesis of diseases asthma and CP.



MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2016/2017

Ústav: Ústav biochemie

Student: Bc. Július Jánoš

Program: Biochemie

Obor: Biochemie

Ředitel Ústavu biochemie PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce: Adipocytokiny a vybraná zánětlivá onemocnění: studie kontrol a případů

Název práce anglicky: Adipocytokines and selected inflammatory diseases: case-control study

Oficiální zadání:

Společným rysem multifaktoriálních chorob jako je obezita, diabetes mellitus, chronická parodontitida, gastroezofageální refluxní choroba a astma, je přítomnost low-grade zánětlivého stavu. Role adipocytokinů v patogenezi těchto onemocnění vyplývá z interakce mezi tukovou tkání, zánětem a imunitou. Prvním cílem této práce je zpracovat literární rešerži zaměřenou na adipocytokiny a jejich vztah k vybraným zánětlivým chorobám. Druhým cílem je v rámci asociační studie kontrol a případů determinovat varianty v genech pro adipocytokiny a korelovat získaná data s klinickými a biochemickými parametry.

Jazyk závěrečné práce: slovenština

Vedoucí práce: Mgr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D.

Datum zadání práce: 27. 9. 2016

V Brně dne: 25. 10. 2016

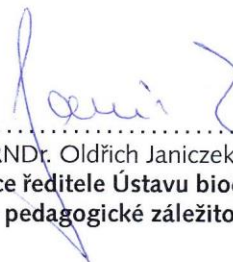
Souhlasím se zadáním (podpis, datum):



Bc. Július Jánoš
student



Mgr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D.
vedoucí práce



doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.
zástupce ředitele Ústavu biochemie
pro pedagogické záležitosti

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa chcel poďakovať za finančnú podporu z grantu GAČR GB14-37368G, projektu MUNI/A/1008/2017 a z prostriedkov Lekárskej fakulty Masarykovej univerzity udelených juniorskému výskumníkovi Petre Bořilovej Linhartovej. Ďalej by som sa chcel poďakovať vedúcej mojej práce Mgr. Petre Bořilovej Linhartovej, Ph.D za pomoc, trpezlivosť a odborné pripomienky pri písaní tejto práce, a prof. MUDr. Lydii Izakovičovej Hollej, Ph.D. Mgr. et Mgr. Simone Slezákovej, Bc. Tereze Deissovej, Bc. Davidovi Novákovi, Dane Ambrozkovej a Andrei Stejskalovej ďakujem za pomoc pri laboratórnych analýzach a spríjemnenie práce v laboratóriu, a nakoniec rodičom, Mimke, priateľom a všetkým blízkym za podporu pri písaní tejto práce.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som svoju diplomovú prácu vypracoval samostatne s využitím informačných zdrojov, ktoré sú v práci citované.

Brno, 13.5.2018

.....
Július Jánoš

1 OBSAH

2	Zoznam skratiek.....	10
3	Úvod	12
4	Cieľ práce	13
5	Teoretická časť	14
5.1	Zápal a chronické zápalové ochorenia	14
5.1.1	Gastroezofageálna refluxná choroba (GERD)	14
5.1.2	Astma	15
5.1.3	Diabetes mellitus 2. typu (T2DM)	16
5.1.4	Chronická parodontitída (CP)	17
5.2	Obezita.....	18
5.3	Tukové tkanivo a adipocytokíny	18
5.3.1	Adiponektín.....	18
5.3.2	Leptín	25
5.3.3	Rezistín.....	28
6	Praktická časť	32
6.1	Metodika.....	32
6.1.1	Stanovenie genotypov pomocou PCR a reštrikčnej analýzy	32
6.1.2	Stanovenia genotypov pomocou Real-time PCR.....	33
6.1.3	Stanovenie hladín adipocytokínov pomocou ELISA.....	33
6.1.4	Štatistická analýza.....	35
6.2	Štúdia GERD	36
6.3	Štúdia ASTMA.....	36
6.4	Štúdia T2DM a CP	36
6.5	Výsledky.....	37
6.5.1	Štúdia GERD.....	37
6.5.2	Štúdia ASTMA	38
6.5.3	Štúdia T2DM a CP	40
6.6	Diskusia	45
6.6.1	Štúdia GERD.....	45
6.6.2	Štúdia ASTMA	46
6.6.3	Štúdia T2DM a CP	47

7	Súhrn.....	51
8	Summary.....	52
9	Literatúra.....	53

2 Zoznam skratiek

ADIPOQ – adiponektín (adiponectin)

AgP - agresívna parodontitída (aggressive periodontitis)

ANOVA – analýza variancie (analysis of variance)

BE - Barrettov ezofagus (Barrett's esophagus)

BMI - index telesnej hmotnosti (body mass index)

CAL – strata attachmentu (clinical attachment loss)

CP - chronická parodontitída (chronic periodontitis)

CVD - kardiovaskulárne ochorenie (cardiovascular disease)

DM - diabetes mellitus

EAC - adenokarcinóm ezofagu (esophageal adenocarcinoma)

ELISA - (enzyme linked immunosorbent assay)

GCF – sulkulárna tekutina (gingival crevicular fluid)

GERD - gastroezofageálna refluxná choroba (gastroesophageal reflux disease)

HC - zdravé kontroly (healthy controls)

HMW – vysokomolekulárny (high-molecular weight)

HRP - chrenová peroxidáza (horseradish peroxidase)

HWE - Hardy-Weinbergova rovnováha (Hardy-Weinberg equilibrium)

IL – interleukín (interleukin)

IQR - medzikvartilové rozpätie (interquartil range)

LEP – leptín (leptin)

LEPR - leptínový receptor (leptin receptor)

LMW – nízkomolekulárny (low-molecular weight)

MAF - frekvencia minoritnej alely (minor allele frequency)

MMW – strednomolekulárny (middle-molecular weight)

N – počet (number)

NAFLD - nealkoholová tuková choroba pečene (non-alcoholic fatty liver disease)

NCBI - národné centrum biotechnologických informácií (National Center for Biotechnology Information)

NERD - neerozívna refluxná choroba (nonerosive reflux disease)

NF- κ B - nukleárny faktor kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NS – nesignifikantné (nonsignificant)

PCR-RFLP - polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov (restriction fragment length polymorphism)

PD - hĺbka parodontálnych chobotov (probing depth)

RETN – rezistín (resistin)

ROS - reaktívne kyslíkové častice (reactive oxygen species)

SD - smerodajná odchýlka (standard deviation)

SNP - jednonukleotidový polymorfizmus (single nucleotide polymorphism)

STAT3 - signálny prenášač a aktivátor transkripcie 3 (signal transducer and activator of transcription 3)

T1DM - diabetes mellitus 1. typu (type 1 diabetes mellitus)

T2DM - diabetes mellitus 2. typu (type 2 diabetes mellitus)

TNF- α - tumor nekrotizujúci faktor-alfa (tumor necrosis factor alpha)

3 Úvod

Zápal je základnou odozvou organizmu na poškodenie. V prípade chronického zápalu však dochádza za súhry deštrukčných a reparačných procesov mediovaných zápalovými a protizápalovými látkami imunitného systému k nezvratnej zmene štruktúry tkanív. Medzi látky sprostredkujúce zápalové procesy patria aj adipocytokíny, látky produkované nielen adipocytmi v tukovom tkanive.

Obezita, charakteristická značne zvýšeným množstvom adipocytov, je spájaná s nadprodukciou zápalových, resp. s deficitom protizápalových adipocytokínov. Často sa preto asocjuje s chronickým zápalom a je rizikovým faktorom pre ďalšie chronické ochorenia. Spoločným menovateľom ochorení gastroezofageálnej refluxnej choroby (GERD), astmy, diabetes mellitus 2. typu (T2DM) a chronickej parodontitídy (CP) je práve chronický zápal. Sú to multifaktoriálne ochorenia, k vypuknutiu a progresii ktorých okrem vonkajších rizikových faktorov prispievajú aj genetické predispozície.

S postupujúcimi metódami štúdia genómu je možné sledovať variácie v génoch (napríklad jednonukleotidové polymorfizmy, SNP). Ide o mutácie v sekvencii DNA, pričom ich výskyt v populácii je minimálne 1 %. Tieto variácie sa vyskytujú v intrónoch, exónoch, alebo regulačných častiach génov a môžu tak ovplyvňovať expresiu a teda aj funkciu, využiteľnosť a koncentráciu proteínu v organizme. Výskyt a percentuálne zastúpenie polymorfizmov sa líši naprieč populáciami, preto je potrebné variácie študovať osobitne a porovnávať výsledky s výsledkami v ostatných populáciách.

Vo svojej práci sa zameriavam na polymorfizmy v génoch pre adipocytokíny, konkrétne adiponektín, leptín a rezistín.

4 Cieľ práce

Cieľom diplomovej práce v teoretickej časti je vytvoriť kontext problematiky chronického zápalu, obezity, chronických ochorení GERD, astmy, T2DM a CP a spracovať literárnu rešerš zameranú na adipocytokíny adiponektín, rezistín a leptín v súvislosti so spomenutými ochoreniami. Na základe rešerše budú pre praktickú časť diplomovej práce vybraté polymorfizmy v génoch spomenutých adipocytokínov.

Cieľom praktickej časti diplomovej práce je analyzovať variabilitu vybraných polymorfizmov v troch separátnych štúdiách zdravých kontrol a pacientov trpiacich GERD, astmou a T2DM a/alebo CP z Českej republiky.

5 Teoretická časť

V teoretickej časti práce je stručne definovaný zápal a študované ochorenia GERD, astma, T2DM a CP, pre ktoré je zápal typický. Navyše je osvetlená rola obezity ako rizikového faktoru pre viaceré ochorenia. Následne je popísané adipózne tkanivo a adipocyty, produkujúce adipocytokíny. Okrem podrobnejšieho popisu adipocytokínov adiponektínu, leptínu a rezistínu sú prehľadne v tabuľkách taktiež zaznamenané výsledky doterajších asociačných štúdií v rôznych populáciách. Štúdie boli zamerané na konkrétne polymorfizmy v génoch pre adipocytokíny a koncentrácie adipocytokínov v telesných tekutinách u pacientov s GERD, astmou, T2DM a parodontitídou.

5.1 Zápal a chronické zápalové ochorenia

Zápal je jednou zo základných reakcií organizmu na poškodenie, zdrojom ktorého môže byť bakteriálna infekcia, fyzické narušenie tkaniva, účinok chemikálií alebo radiácie. Organizmus sa bráni aktivovaním nešpecifických aj špecifických zložiek imunitného systému, prejavom čoho sú napr. príznaky typické pre kožné tkanivo – rubor (sčervenanie), tumor (opuch), calor (teplota), dolor (bolesť) a functio laesa (strata funkcie). Prejavy zápalu sú ale rôznorodé v závislosti na vlastnostiach poškodených tkanív. Všeobecne rozlišujeme medzi zápalom akútnym a chronickým. Priebeh akútneho zápalu možno na časovej osi rozdeliť do troch fáz – iniciačnej, vrcholnej a reparačnej, na konci ktorej je zápal ukončený a napadnuté tkanivo zhojené. V prípade perzistencie zápalu prechádza proces zápalu do chronického štádia. Chronický zápal je typický zápalovými a súčasne prebiehajúcimi reparačnými procesmi, ktoré nevedú k terminácii zápalu, ale indukujú deštrukciu tkanív (Povýšil a kol., 2011).

Chronický zápal je spoločným menovateľom viacerých ochorení, patria medzi ne GERD, astma, T2DM alebo CP (Fantuzzi, 2005).

5.1.1 Gastroezofageálna refluxná choroba (GERD)

Funkciou ezofagu je posun rozžutej potravy do žalúdka. Návratu potravy do ezofagu (reflux) bráni dolný zvierač, k funkcii ktorého prispievajú aj bránica a bráničný hiatus. Gastroezofageálny reflux je retrográdny posun žalúdočného obsahu do ezofagu, v ktorom spôsobujú komplikácie predovšetkým kyselina chlorovodíková (HCl), aspartátové proteinázy (pepsín) a žlč (v prípade súčasného duodenogastrického refluxu). Aj u zdravých jedincov sa reflux môže prechodne vyskytovať, obzvlášť v období medzi jedlami (asi v 7% prípadov). Vznik refluxu je spôsobený porušením antirefluxnej bariéry, v ktorej kľúčová

úlohu zohráva dolný zvierač ezofagu. Ak k refluxu dôjde, je dôležitá tiež správna motilita ezofagu zaistujúca rýchle vyprázdenie ezofagu, čím sa skracuje doba kontaktu ezofageálnej sliznice s HCl, proteinázami, prípadne so žľou.

GERD je definovaná ako spektrum postihnutí ezofagu spôsobené gastroduodenálnym refluxom. Pri GERD vzniká zápalová reakcia vyvolávajúca postihnutie vagovej inervácie, čím sa porušuje motilita ezofagu a spomaľuje vyprázdňovanie žalúdka. GERD môže vyvolať komplikácie ako ezofagitídu, ulcerácie, striktúry a krvácanie. Pri dlhodobom refluxe dochádza ku komplikácii známej ako Barrettov ezofagus (BE), ktorý vzniká ako odpoveď na pravidelné vystavenie sliznice ezofagu kyslému obsahu žalúdka. Dlaždicový epitel je metapláziou nahradený cylindrickým epitelom, ktorý je odolnejší voči HCl a fyziologicky sa nachádza prevažne v terminálnej časti ezofagu. Metaplázia sa môže zmeniť na dyspláziu, čo je prekancerózný stav adenokarcinómu ezofagu (EAC) (Nečas, 2003). Prevalencia GERD je 8,8 až 25,9 % v európskych krajinách (El-Serag a kol., 2014). Rizikovým faktorom pre GERD je obezita, obzvlášť v abdominálnej oblasti, ktorá môže spôsobovať tlak na žalúdok, ezofagus a narušovať funkčnosť antirefluxnej bariéry (Pandolfino a kol., 2006).

Rola genetických faktorov je predmetom štúdia aj u ochorenia GERD. Dong a kol. (2018) vo svojej štúdii vybrali 23 genetických mutácií asociovaných s rizikom rozvoja GERD a vyvinuli model predpovede rizika vzniku BE a EAC, ktorý je založený na genetických, klinických a demografických / životných podmienkach (Dong a kol., 2018).

5.1.2 Astma

Astma je jedno z najrozšírenejších chronických ochorení s prevalenciou 10 až 15% v rozvinutých krajinách (Bowrey a kol., 2000). Radí sa medzi zápalové ochorenia dolných dýchacích ciest, pričom značnú rolu v zápale hrajú zmenené imunitné funkcie. Chronický zápal postihuje najmä priedušky, kde dochádza k obštrukcii a hyperreaktivite, čo je príčinou klasických symptómov astmy ako je hvízdavé dýchanie, záchvaty kašľa alebo zvieravý pocit na hrudi. V dôsledku chronického zápalu dochádza k remodelácii pľúcneho tkaniva, čo následne vedie k nezvratne zníženej kapacite pľúc.

Astma je veľmi heterogénne ochorenie s rôznorodou patofyziológiou. Práve rôznorodosť viedla k definovaniu tzv. fenotypov a endotypov astmy, ktoré kategorizujú astmu podľa patofyziologických, klinických, genetických alebo epidemiologických znakov. Z hľadiska imunopatogenézy sa astma kategorizuje na tri hlavné fenotypy.

Najlepšie popísaná a najrozšírenejšia je atopická astma charakterizovaná eosinofilným zápalom mediovaným protilátkami IgE a následnou imunitnou odpoveďou Th2 lymfocytmi. Atopická astma sa často manifestuje už v detskom veku a dá sa pre ňu stanoviť príčinný alergén, alebo alergény. Tými sú najčastejšie spóry plesní, roztoče, zvieracie alergény, peľ a niektoré potraviny. Podmienkou je genetická predispozícia, ktorá je dlho náplňou štúdia.

Druhý fenotyp je zriedkavejší, má taktiež priebeh eosinofilného zápalu, avšak chýba mu príčina vo forme alergénu. Prejavuje sa často až v dospelosti a je spájaný s autoimunitnými ochoreniami, alebo intoleranciou na určité lieky.

Pre tretí fenotyp astmy nie je eosinofilný zápal typický. Bunky spôsobujúce zápal sú prevažne neutrofilné granulocyty. Nástup ochorenia je typický až v dospelosti a fenotyp je spájaný s rizikovými faktormi fajčením a obezitou. (Krejsek a kol., 2016)

Rizikovými faktormi pre astmu sú jednak environmentálne faktory, ako aj dedičné predispozície. Genetické faktory hrajú rolu v rozvoji, ale aj priebehu a závažnosti astmy a pôsobia primárne cez komplexné mechanizmy zahŕňajúce interakciu s environmentálnymi faktormi a ďalšími génmi (Rava a kol., 2015).

Astma je jednak klinické ochorenie, okrem toho je ale aj rizikovým faktorom pre ďalšie ochorenia, medzi ktoré sa radí aj GERD (Bowrey a kol., 2000).

5.1.3 Diabetes mellitus 2. typu (T2DM)

Charakteristickým rysom T2DM je hyperglykémia, prípadne aj glykosuria, funkčná strata inzulínu a porušenie glukózovej tolerancie. (Nečas, 2003). T2DM je najrozšírenejšou formou diabetu. (Mealey a kol., 2007).

Mierny deficit inzulínu sa prejaví hyperglykémiou po požití jedla, pričom koncentrácia glukózy nalačno ostáva normálna. S nárastom deficitu účinku inzulínu sa zvyšuje hyperglykémia a prejavuje sa aj v období lačnenia, navyše, v prípade, že glykémia prekročí renálny prah (schopnosť obličiek reabsorbovať glukózu z primárneho moču), dôjde ku glykosurii. V dôsledku osmotickej aktivity glukózy je pri jej nadbytku výskyt aj polyurie. Osmotická diuréza prispieva taktiež k deplécii sodíka a draslíka, čo spôsobuje ďalšie komplikácie, napríklad poruchy srdcovej činnosti a vznik arytmií.

Pri nedostatku inzulínu sa hlavným zdrojom energie stávajú lipidy. Lipolýza je charakterizovaná β -oxidáciou voľných mastných kyselín, ktorej medziproduktami sú

ketolátky (kys. hydroxymaslová, kys. acetoctová a acetón), spôsobujúce metabolickú acidózu.

Z dlhodobého hľadiska má hyperglykémia negatívny vplyv na endotel ciev, pretože nadbytočná glukóza sa nešpecificky a neenzymaticky viaže na proteíny endotelu a vznikajú stabilné komplexy. Tkanivá tak strácajú svoju funkciu, prípadne môže glukóza viazať neglykosylované plazmatické alebo intersticiálne proteíny. Podľa miesta poškodenia ciev preto môže dôjsť k rozvoju mikrovaskulárnych a makrovaskulárnych komplikácií diabetu (Nečas, 2003). Medzi ne patrí aj chronická parodontitída (Mealey a kol., 2006).

Jedným z hlavných rizikových faktorov diabetu je obezita. Inzulínová rezistencia je negatívne ovplyvňovaná zvýšenými koncentráciami voľných mastných kyselín (MK), pochádzajúcich z adipocytov. MK prispievajú k rezistencii na inzulín inhibíciou príjmu glukózy, syntézy glykogénu a glykolýzy a podporou produkcie hepatickej glukózy (Bergman a kol., 2000).

T2DM je multifaktoriálne ochorenie, k rozvoju ktorého prispievajú okrem vonkajších faktorov aj faktory neovplyvniteľné, genetické, čo preukázali aj štúdie na dvojčikách a izolovaných etnických populáciách (Baier a kol., 2004; Medici a kol., 1999). Pri T2DM môžu rolu zohrávať mutácie inzulínového receptora podporujúce rezistenciu tkanív na inzulín, mutáciou indukovaná zmena funkcie látok zabezpečujúcich postreceptorový prenos signálu, a ďalšie.

5.1.4 Chronická parodontitída (CP)

CP je chronické zápalové ochorenie závesného aparátu zubov. Vzniká z neliečeného zápalu ďasien – gingivitídy a poškodzuje alveolárnu kosť, zubný cement a väzivá a môže viesť až ku strate zubov.

Nevyhnutným, aj keď nie jediným spúšťačom ochorenia je prítomnosť gramnegatívnych baktérií (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) v zubnom povlaku a v subgingive. Prítomnosť plaku je dôvodom pre vznik lokálnej zápalovej reakcie, ktorá nedokáže eliminovať mikrobiálne podnety a tak prerastá do chronického zápalu, ktorý je ale dynamický a striedajú sa v ňom fázy aktívneho procesu s fázami remisíí (Pihlstrom a kol., 2005).

Z hľadiska rizík je CP multifaktoriálne ochorenie, na progresii sa podieľajú okrem environmentálnych (stres, fajčenie, obezita, atď.) aj genetické predispozície. Kandidátnymi

génmi hrajúcimi rolu v tomto ochorení sú gény ovplyvňujúce metabolizmus kostí a väziva a gény pre imunoregulačné faktory (Van Dyke a kol., 2005).

5.2 Obezita

Obezita je prevládajúci a šíriaci sa celosvetový problém (World Health Organisation 2018). Nadváha a obezita sú kategorizované pomocou indexu telesnej hmotnosti (BMI), s hodnotami $\geq 25 \text{ kg.m}^{-2}$, resp. $\geq 30 \text{ kg.m}^{-2}$. Ide o komplexné multifaktoriálne ochorenie vznikajúce nadmerným ukladaním tuku. Obezita je rizikovým faktorom a zhoršuje priebeh ochorení, ako sú rozvoj rezistencie k inzulínu a T2DM (Festa a kol., 2000; Bergman a kol., 2000), vysoký krvný tlak, metabolický syndróm, GERD, hypoventilácia a i.(Bouldin a kol., 2006).

5.3 Tukové tkanivo a adipocytokíny

Napriek dlhotrvajúcim domnienkam o jeho pasívnosti, je tukové tkanivo komplexný a vysoko metabolicky aktívny endokrinný orgán. Okrem skladovania energie vo forme tukov taktiež sekretuje bioaktívne molekuly ako sú leptín, rezistín, adiponektín a visfatín, ktoré sa spoločne nazývajú adipocytokíny (Krysiak a kol., 2012; Adamczak a kol., 2013). Tie sú podskupinou cytokínov, nízkomolekulárnych signálnych proteínov, ktoré regulujú imunitnú odpoveď a ovplyvňujú funkciu a aktivitu buniek. Produkované sú nielen adipocytmi a neadipocytovou zložkou tukového tkaniva, ale napríklad aj T lymfocytmi a parodontálnymi väzivovými bunkami (Sanna a kol., 2003). Adipocytokíny nielenže regulujú senzitivitu k inzulínu, výdaj a spotrebu energie, ale tiež hojenie rán a zápal. Adipocytokíny leptín, rezistín a sú celkovo prozápalové, zatiaľ čo adiponektín vykonáva protizápalové účinky. Obezita vedie k nárastu syntézy prozápalových adipocytokínov a k poklesu produkcie protizápalových adipocytokínov.

Porušenie rovnováhy medzi prozápalovými a protizápalovými adipocytokínmi ústi do stavu tzv. low-grade chronického zápalu. Takýto stav je pozorovaný okrem iného aj u obezity a diabete mellitus (Krysiak a kol., 2012; Adamczak a kol., 2013).

5.3.1 Adiponektín

Adiponektín je cytokín primárne produkovaný bielym tukovým tkanivom adipocytmi, a netukovými bunkami so zvýšenou expresiou a sekréciou počas diferenciácie adipocytov. Taktiež je produkovaný myocytmi, kardiomyocytmi a endoteliálnymi bunkami (Stofkova, 2009).

Existujú dve izoformy adiponektínu: neštiepený adiponektín (full-length) a globulárny adiponektín, ktorý vzniká fotolytickým štiepením mediovaným elástázou produkovanou monocytmi alebo neutrofilmi. Globulárny adiponektín reprezentuje približne 1 % celkového množstva adiponektínu.

Monomérny adiponektín o veľkosti 30 kDa sa vyskytuje výlučne v plazme adipocytov. V periférnej krvi cirkuluje vo forme oligomérov o nízkej (trimér), strednej (hexamér), alebo vysokej molekulárnej hmotnosti (12- a 18-mér) (Tilg a kol., 2006).

Izoformy adiponektínu sa líšia vo svojej biologickej funkcii, v závislosti od tkaniva a podtypu receptora. Adiponektín je rozoznávaný dvoma receptormi, AdipoR1 a AdipoR2, pričom podtyp AdipoR1 je hojne exprimovaný v kostrovom svalstve a viaže globulárny adiponektín, kdežto AdipoR2 je zväčša exprimovaný v pečeni a viaže sa s neštiepeným adiponektínom (Kadowaki a kol., 2005).

Koncentrácia adiponektínu v cirkulácii je v porovnaní s ostatnými cytokínmi vysoká (3,6 až 16,7 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) (Yoshino a kol., 2011; Rho a kol., 2009). V prípade zápalového ochorenia gastrointestinálneho traktu GERD a BE bola koncentrácia adiponektínu nižšia v porovnaní so zdravými kontrolami (Rubenstein a kol., 2008; Tseng a kol., 2015). Podobne boli nižšie plazmatické koncentrácie adiponektínu namerané aj u zápalových ochorení astme (Ozde a kol., 2015; Baek a kol., 2011; Sood a kol., 2012) a T2DM (Saito a kol., 2007). Navyše, kombinácia viacerých ochorení rezultovala v ešte nižších koncentráciách, napr. pri komplikáciách T2DM (ischemická choroba srdca, hypertenzia, infarkt myokardu) (Swellam a kol., 2009), alebo pri spojení astmy s obezitou (Baek a kol., 2011). Obrátene, zvýšená koncentrácia adiponektínu bola korelovaná s redukciou hmotnosti (Inadera, 2008). Prehľadový asociačný štúdií ochorení s koncentraciami adiponektínu sa nachádzajú v prehľadových **tabuľkách I** (GERD), **II** (astma) a **III** (T2DM a CP).

Ľudský adiponektín je kódovaný génom *ADIPOQ* lokalizovaným na chromozómovom lokuse 3q27. Gén pozostáva z troch exónov a jeho sekvencia zdieľa homológne úseky s génmi pre kolagénne proteíny, proteíny tvoriace komplement, tumor nekrotizujúci faktor α (TNF- α) a mozgovo špecifický faktor cerebelín (Carbone a kol., 2012). V géne sa nachádzajú polymorfizmy, z ktorých najviac študované sú zámeny +276G/T (rs1501299) a +45T/G (rs2241766).

V spojení s karcinómom ezofagu vykazoval genotyp GG polymorfizmu +276G/T nesignifikantnú asociáciu (Doecke a kol., 2008). Varianta +276G/T bola okrem GERD študovaná aj v spojení s astmou, pri ktorej bol genotyp TT asociovaný s ochorením

v čínskej populácii (Ding a kol., 2015). Genotyp GG polymorfizmu +276G/T (rs15011299) bol asociovaný so zvýšeným rizikom T2DM v japonskej populácii (Hara a kol., 2002), pri štúdiu tohto polymorfizmu v haplotype s polymorfizmami na miestach -11377; +45; +349 a -11365, -4034, -3964, +45 bola G alela frekventovanejšia v skupine T2DM (Choi a kol., 2014; Qi, Doria, a kol., 2006). Naopak, Li a kol. pri štúdiu polymorfizmu +276G/T v haplotype s ďalšími dvoma polymorfizmami na čínskej populácii spájal alelu T s rizikom T2DM. Štúdium polymorfizmu s mikrovaskulárnymi komplikáciami T2DM retinopatiou a neuropatiou nepreukázali žiadnu asociáciu (Choe a kol., 2013), okrem toho Gu a kol. (2004) nenašli spojenie medzi polymorfizmom a T2DM.

Genotyp GG polymorfizmu +45T/G bol vo viacerých štúdiách asociovaný s diabetom a jeho komplikáciou, diabetickou nefropatiou (Choe a kol., 2013; Hara a kol., 2002). Podľa Gu a kol. (2004) vo švédskej populácii nebola objavená asociácia medzi týmto polymorfizmom a T2DM. Naopak, v kórejskej a japonskej populácii bola asociovaná alela T s T2DM a ťažkou formou parodontitídy u obéznych pacientov. Prehľad štúdií skúmajúcich polymorfizmy v géne pre adiponektín sú uvedené a rozdelené podľa ochorení v **tabuľkách I, II a III.**

Tabuľka I: Adiponektín – asociácie plazmatických/sérových koncentrácií a polymorfizmov s GERD

Polymorfizmus	Citácia	Sledované ochorenia	Asociácie	Koncentrácia adiponektínu v plazme/sére ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
+276G/T (rs1501299)	Doecke a kol., 2008	GERD (EAC), obezita	NS	-
-	Almers a kol., 2015	GERD (BE)	Vyššia c adiponektínu asociovaná s BE a GERD	v sére GERD $11,7 \pm 6,8$ BE $12,8 \pm 7,7$ Kontroly $12,1 \pm 6,7$
-	Garcia a kol., 2014	GERD (BE), obezita	NS	v sére BE $7,42 (3,8 - 12,2)$ Kontroly $5,61 (3,3 - 9,2)$
-	Greer a kol., 2015	GERD (BE, EAC), obezita	Horný tercil pacientov s najvyššou c sérového adiponektínu asociovaný negatívne s BE (preukázané vo väčšej miere v skupine mužov)	v sére BE + GERD $8,39$ GERD $8,82$ Kontroly $10,36$
-	Kendall a kol., 2007	GERD (BE)	NS	v sére ♀; BE $9,68$ Kontroly $11,22$ ♂ BE $8,0$ Kontroly $8,69$
-	Rubenstein a kol., 2008	GERD (BE)	c adiponektínu negatívne koreluje s BE	v plazme BE $8,4$ Kontroly $11,4$
-	Rubenstein a kol., 2009	GERD (BE)	Zvýšená c LMW adiponektínu asociovaná so zníženým rizikom BE. c celkového adiponektínu nebola asociovaná s BE	v sére LMW adiponektín BE $1,80 \pm 1,09$ Kontroly $2,17 \pm 1,08$
-	Tseng a kol., 2015	GERD (BE)	Pacienti s BE signifikantne nižšie c adiponektínu v porovnaní s kontrolami	v sére BE $6,0 (5,1-9,2)$ Kontroly $9,2 (7,1-11,2)$

BE=Barrettov ezofagus, EAC=adenokarcinóm ezofagu, GERD=gastroezofageálna refluxná choroba, LMW=nízkomolekulárna izoforma adiponektínu, NS=nesignifikantné

Tabuľka II: Adiponektín – asociácie plazmatických/sérových koncentrácií a polymorfizmov s astmou

Polymorfizmus	Citácia	Sledované ochorenia	Asociácie	Koncentrácia adiponektínu v plazme/sére ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
+276G/T (rs1501299)	Ding a kol., 2015	Astma	Genotyp TT asociovaný so zvýšeným rizikom astmy alela T asociovaná so zvýšeným rizikom astmy v log-aditívnom modeli	v plazme Exacerbácia $11,7 \pm 6,2$ Remisia $19,3 \pm 7,5$ Kontroly $24,6 \pm 8,9$
-	Ozde a kol., 2015	Astma	Signifikantne nižšia c adiponektínu v skupine detí trpiacich astmou v porovnaní s kontrolami	v sére Astma $10,0 \pm 5,3$ Kontroly $15,8 \pm 10,5$
-	Baek a kol., 2011	Astma, obezita	Signifikantne znížené c adiponektínu u obéznych detí trpiacich astmou	v sére Astma+obezita $5,10 \pm 3,35$ Obezita $7,28 \pm 3,82$ Kontroly $12,53 \pm 5,02$
-	Tsaroucha a kol., 2013	Astma	c sérového adiponektínu bez rozdielu medzi astmatikmi a kontrolami ($P=0,162$), avšak po rozdelení astmatikov na dve skupiny podľa závažnosti astmy podľa klinických príznakov mali pacienti s vážnou formou astmy signifikantne nižšie c adiponektínu ($P<0,015$) v porovnaní so skupinou s miernou formou astmy	v sére Astma $13,5 \pm 9,2$ Kontroly $10,1 \pm 6,4$ Vážne prípady astmy $9,8 \pm 7,8$ Mierne prípady astmy $16,6 \pm 9,3$
-	Sood a kol., 2012	Astma	Nízka c adiponektínu, signifikantne asociovaná s astmou u žien v strednom veku (nezávisle na BMI) Nízka c adiponektínu indikovala vyššie riziko pre rozvoj astmy, predovšetkým u fajčiarok	v sére Astma $9,4$ Kontroly $11,2$
-	Hayashikawa a kol., 2015	Astma	Celková c sérového adiponektínu bez asociácie k astme, avšak po rozdelení celkovej c adiponektínu na LMW, MMW a HMW izoformy vyššia c LMW adiponektínu u astmatikov v porovnaní s kontrolami ($P<0,05$)	v sére celkový adiponektín Astma $6,88 \pm 3,48$ Kontroly $7,04 \pm 3,97$ ($P=0,781$) LMW adiponektín Astma $2,20 \pm 0,77$ Kontroly $1,95 \pm 0,72$ ($P<0,05$)

BMI=index telesnej hmotnosti, HMW=vysokomolekulárna izoforma adiponektínu, LMW=nízkomolekulárna izoforma adiponektínu, MMW=strednomolekulárna izoforma adiponektínu

Tabuľka III: Adiponektín – asociácie plazmatických/sérových koncentrácií a polymorfizmov s T2DM a/alebo CP

Polymorfizmus	Citácia	Sledované ochorenia	Asociácie	Koncentrácia adiponektínu v plazme/sére ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
+276G/T (rs1501299)	Gu a kol., 2004	T2DM	NS	-
	Choe a kol., 2013	T2DM	NS	v plazme GG $9,6 \pm 8,3$ GT $10,7 \pm 9,6$ TT $9,3 \pm 8,6$
	Choi a kol., 2014	T2DM	G-T-T-A haplotyp na miestach -11377; +45; +276; +349 v géne <i>ADIPOQ</i> asociovaný s vyšším výskytom T2DM v kórejskej populácii	-
	Hara a kol., 2002	T2DM	GG genotyp asociovaný so zvýšeným rizikom pre T2DM v japonskej populácii G alela asociovaná s nižšou c adiponektínu	v plazme GG $14,2 \pm 0,56$ GT $15,5 \pm 0,61$ TT $17,3 \pm 1,35$
	Li a kol., 2015	T2DM	Analýza haplotypov zložených z troch polymorfizmov (rs 182052, rs7627128 a rs1501299) indikovala zvýšenú frekvenciu haplotypu A-A-T u pacientov s T2DM	-
	Qi a kol., 2006	T2DM, CVD	Analýza haplotypov zložených z piatich polymorfizmov (-11365, -4034, -3964, +45, +276) indikovala, že alela +276T v haplotype CAATT bola asociovaná s nižším rizikom na CVD u pacientov s T2DM v porovnaní s haplotypom CAATG	v plazme NS
+45T/G (rs2241766)	Choi a kol., 2014	T2DM	G-T-T-A haplotyp na miestach -11377; +45; +276; +349 v géne <i>ADIPOQ</i> asociovaný s vyšším výskytom T2DM v kórejskej populácii	-
	Gu a kol., 2004	T2DM	NS	-
	Choe a kol., 2013	T2DM	GG genotyp asociovaný s diabetickou nefropatiou	v plazme TT $9,8 \pm 8,5$ TG $10,2 \pm 8,8$ GG $10,5 \pm 11,5$
	Damrongrungruang a kol., 2015	T2DM, CP	T alela asociovaná s ťažkou formou paradontitídy u obéznych pacientov	-

	Hara a kol., 2002	T2DM	GG genotyp asociovaný so zvýšeným rizikom pre T2DM v japonskej populácii	-
	Qi a kol., 2006	T2DM	G alela asociovaná s vyššími c adiponektínu u žien s T2DM	v plazme TT 7,17 GT + GG 8,22
-	Saito a kol., 2007	T2DM	c adiponektínu nižšia u pacientov s T2DM v porovnaní s kontrolami	v sére T2DM 6,0 Kontroly 9,0
-	Swellam a kol., 2009	T2DM	c adiponektínu v sére nižšia u pacientov s T2DM. Komplikácie spojené s T2DM: ischemická choroba srdca, hypertenzia, infarkt myokardu	v sére T2DM s komplikáciami 7,4 T2DM bez komplikácií 12,5 Kontroly 32,9
-	Morales a kol., 2004	T1DM, T2DM	Rôzne c adiponektínu u detí s ochorením T1DM a T2DM môžu viesť k jednoduchšiemu rozoznaniu formy diabetu	v sére T2DM 5,5 T1DM 10,2 Kontroly 10,6
-	Weyer a kol., 2001	T2DM, obezita	c adiponektínu nepriamoúmerná percentu telesného tuku, BMI a c inzulínu v krvi	v sére T2DM $5,5 \pm 1,6$ Kontroly $7,5 \pm 2,7$
-	Nokhbehsaim a kol., 2014	T2DM, CP obezita	Adiponektín zvyšuje schopnosť regenerácie buniek parodontu po chirurgickom zákroku	<i>in vitro</i> štúdia

ADIPOQ=adiponektín, BMI=index telesnej hmotnosti, CP=chronická parodontitída, CVD=kardiovaskulárne choroby, NS=nesignifikantné, T1DM=diabetes mellitus 1. typu, T2DM=diabetes mellitus 2. typu

5.3.2 Leptín

Leptín, hormón s vlastnosťami cytokínov, je cirkulujúci neglykosylovaný peptid o veľkosti 16 kDa (Zhang a kol., 1997). Je produkovaný najmä tukovým tkanivom a jeho koncentrácie priamo korelujú s množstvom telesného tuku a veľkosťou adipocytov (Houseknecht a kol., 1998). V menšom množstve je produkovaný inými tkanivami, ako sú žalúdok, kostrové svalstvo, placenta a kostná dreň.

Produkcia leptínu je regulovaná hlavne príjmom potravy a následnou hormonálnou reakciou na jedenie, pretože inzulín zvyšuje sekréciu leptínu (Friedman a kol., 1998).

Prozápalové látky endotoxín (lipopolysacharidy gramnegatívnych baktérií), IL-1 a TNF- α taktiež zvyšujú koncentráciu cirkulujúceho leptínu (Grunfeld a kol., 1996). Leptín pôsobí centrálné na hypotalamus, inhibujúc anabolické a aktivujúc katabolické dráhy a navyše inhibuje apetít a stimuluje výdaj energie (Schwartz a kol., 2000). Periférne leptín zvyšuje bazálny metabolizmus, ovplyvňuje reprodukciu, reguluje funkciu pankreatických buniek a sekréciu inzulínu a pôsobí na generovanie T lymfocytov a diferenciáciu pomocných Th1 lymfocytov v lymfatických uzlinách (Chehab a kol., 1996; Lord a kol., 1998).

Pokusy na myšiach deficientných na leptín, resp. na myšiach s deficientným leptínovým receptorom, preukázali vážnu obezitu, zhoršené hojenie rán, hyperglykémiu, intoleranciu na glukózu a zvýšené plazmatické koncentrácie inzulínu. Podanie leptínu korigovalo spomenuté abnormality (Carbone a kol., 2012).

Leptín sprostredkúva svoje účinky väzbou na leptínový receptor LepR. Ten sa alternatívnym splicingom vyskytuje v šiestich izoformách LepRa až LepRf, z ktorých LepRb o plnej dĺžke 1162 aminokyselín je plne schopný prevádzať aktivačné signály do bunky (Gorska a kol., 2010). LepRb je exprimovaný hypotalamom, endoteliálnymi bunkami, pankreatickými beta bunkami, monocytmi/makrofágmi a B lymfocytmi (Tartaglia, 1997).

Tukové tkanivo je primárnym zdrojom leptínu a súčasne najväčším pôsobiskom leptínu. Ten zvyšuje expresiu mitochondriálnych uncoupling proteínov v tukovom tkanive a svaloch podporujúcich termogénu a teda výdaj energie (Commings a kol., 1999).

Leptín reguluje nielen metabolizmus lipidov, ale aj cukrov. U myší deficientných na leptínový gén leptín normalizuje koncentrácie krvnej glukózy a inzulínu, navyše, in vivo štúdia zistila, že dlhodobé podávanie leptínu zvyšuje senzitivitu k inzulínu, naznačujúc účasť leptínu taktiež v regulácii využitia glukózy (Kamohara a kol., 1997). Okrem toho leptín znižuje množstvo GLUT4 glukózových receptorov a teda príjem glukózy v bielom

tukovom tkanive (Benomar a kol., 2006). Leptín sa taktiež ukázal ako hormón znižujúci cirkulujúcu koncentráciu inzulínu, nezávisle na množstve prijatej potravy. Emilsson a kol. 1997 preukázal priamy vplyv leptínu na pankreatické ostrovčeky a inhibíciu sekrécie inzulínu.

Okrem vplyvu leptínu na metabolizmus pôsobí leptín ako efektor aj v imunite. Stimuluje napríklad produkciu prozápalových mediátorov interleukínu-1 (IL-1), IL-6, IL-12, TNF- α , okrem toho má schopnosť aktivovať chemotaxiu neutrofilov a produkciu reaktívnych kyslíkových častíc (reactive oxygen species, ROS), Ďalšou rolou leptínu na vrodenú imunitu je aktivácia NK buniek ovplyvňovaním ich cytotoxicity cez aktiváciu signálneho prenášača a aktivátora transkripcie 3 (STAT3) a IL-2 (Zhao a kol., 2003).

V adaptívnej imunite zohráva leptín rolu v normálnych aj patologických podmienkach. Ovpľyňuje proliferáciu CD4⁺ T lymfocytov, ktoré okrem iného exprimujú LepR a produkujú IL-2, ktorý ďalej podporuje diferenciáciu na pamäťové T lymfocyty. Úloha leptínu v adaptívnej imunite je naznačená aj zistením, že nedostatok leptínu u myši zbavených génu pre leptín je asociovaný s imunosupresiou a týmusovou deficienciou (Lord a kol., 1998).

Koncentrácie leptínu boli skúmané vo vzťahu so zápalovými ochoreniami. U agresívnej formy parodontitídy boli namerané vyššie sérové koncentrácie leptínu v porovnaní s kontrolami (Shi a kol., 2015). Pri meraní v slinách bola koncentrácia leptínu naopak nižšia u pacientov s agresívnou parodontitídou (AgP) ako u kontrol bez parodontitídy (Khorsand a kol., 2016). Vysoká koncentrácia leptínu bola tiež spájaná s BE (Garcia a kol., 2014; Kendall a kol., 2007), a s ochoreniami GERD a astmou v spojení s obezitou (Abdelkader a kol., 2015; Lessard a kol., 2011). Prehľad asociačných štúdií s koncentraciami leptínu sú znázornené v **tabuľkách IV** (GERD), **V** (astma) a **VI** (T2DM a CP).

Leptín je kódovaný génom obezity (*ob* gén), v ktorom sa nachádzajú aj polymorfizmy -2549T/G (rs2167270) a 3'UTR A/G (rs13228377 - netranslatovaná oblasť DNA). Tie boli skúmané vo vzťahu k zápalovým ochoreniam. Szczepankiewicz a kol. (2009) preukázali, že variant T a genotyp TT mutácie -2549T/G a variant A a genotyp AA mutácie 3'UTR A/G mali častejší výskyt v skupine astmatikov v porovnaní so zdravými kontrolami.

V géne pre *LEPR* pre leptínový receptor– sa nachádza tichá mutácia P1019P (rs1805096), skúmaná vo vzťahu k T2DM. Mutantná A alela bola asociovaná s T2DM v čínskej

populácii (Lu a kol., 2009). Prehľad polymorfizmov v géne *ob* a *LEPR* sú zobrazené a rozdelené podľa ochorení v **tabuľkách IV, V a VI**.

Tabuľka IV: Leptín a jeho receptor – asociácie plazmatických/sérových koncentrácií a polymorfizmov s GERD

Polymorfizmus	Citácia	Sledované ochorenia	Asociácie	Koncentrácia leptínu v plazme/sére (ng.ml ⁻¹)
-	Garcia a kol., 2014	GERD (BE), obezita	c cirkulujúceho leptínu signifikantne vyššia u BE pacientov v porovnaní s kontrolami	v sére BE 12,9 (4,6 – 43,0) Kontroly 5,2 (2,6 – 13,8)
-	Kendall a kol., 2007	GERD (BE)	Vysoké c leptínu asociované so zvýšeným rizikom BE u žien, avšak nie u mužov	v sére ♀; BE 26,8 Kontroly 23,7 ♂ BE 13,5 Kontroly 7,6
-	Thomas a kol., 2015	GERD (BE)	NS	v sére GERD+BE 16,15 ± 16,55 GERD 16,66 ± 15,44 Kontroly 15,62 ± 15,21
-	Abdelkader a kol., 2015	GERD, obezita	Zvýšená c leptínu asociovaná so závažnosťou GERD Zvýšená c leptínu asociovaná s obezitou	v sére GERD + obezita 44,0 ± 23,5 GERD 7,5 ± 8,2 Kontroly 7,0 ± 5,9

BE=Barrettov ezofagus, GERD=gastroezofageálna refluxná choroba, NS=nesignifikantné

Tabuľka V: Leptín a jeho receptor – asociácie plazmatických/sérových koncentrácií a polymorfizmov s astmou

Polymorfizmus	Citácia	Sledované ochorenia	Asociácie	Koncentrácia leptínu v plazme/sére (ng.ml ⁻¹)
LEP rs2167270 (-2549T/G)	Szczepankiewicz a kol., 2009	Astma	TT genotyp a T alela častejšia u skupiny astmatikov (p<0.05)	-
LEP rs13228377 (3 UTR A/G)	Szczepankiewicz a kol., 2009	Astma	AA genotyp a A alela častejšia u skupiny astmatikov (p<0.05)	-
-	Lessard a kol., 2011	Astma, obezita	c leptínu vyššia u obéznych astmatikov v porovnaní so skupinou štíhlych astmatikov	v sére Obezita 57,7 ± 30,6 Bez obezity 19,5 ± 19,5 (P < 0,0001)

Tabuľka VI: Leptín a jeho receptor – asociácie plazmatických/sérových koncentrácií a polymorfizmov T2DM a/alebo CP, prípadne AgP

Polymorfizmus	Citácia	Sledované ochorenia	Asociácie	Koncentrácia leptínu v plazme/sére (ng.ml ⁻¹)
LEPR rs1805096 (3057A/G) (P1019P) (rs62589000)	Su a kol., 2016 Meta-analýza	T2DM	A alela asociovaná s T2DM Články meta-analýzy nenájdené/nedostupné.	-
	Yang a kol., 2016 Meta-analýza	T2DM	A alela asociovaná s T2DM	-
	Lu a kol., 2009	T2DM, NAFLD	A alela signifikantne častejšia u T2DM + NAFLD v porovnaní s kontrolami	v plazme T2DM 8,63 ± 5,45 T2DM + NAFLD 13,08 ± 8,82 Kontroly 5,26 ± 2,59
	Shi a kol., 2015	AgP	c leptínu vyššia u pacientov trpiacich AgP v porovnaní s kontrolami	v sére AgP 19,7 ± 4,4 Kontroly 7,5 ± 1,3
-	Khorsand a kol., 2016	AgP	Efekt agresívnej parodontitídy na signifikantne nižšiu c leptínu v slinách v porovnaní s kontrolami	v slinách (pg.ml ⁻¹) AgP 18,1 ± 6,0 Kontroly 33,6 ± 6,6

AgP=agresívna parodontitída, NAFLD=nealkoholová tuková choroba pečene, T2DM=diabetes mellitus 2. typu

5.3.3 Rezistín

Ľudský rezistín je 12,5 kDa veľký proteín skladajúci sa vo funkčnej podobe zo 108 aminokyselín (Steppan a kol., 2001). Podobne ako adiponektín má rezistín tendenciu tvoriť oligoméry, tým pádom cirkuluje v sére v rôznych nízko- a vysokomolekulárnych izoformách (Gerber a kol., 2005). Rezistín indukuje expresiu rôznych prozápalových cytokínov, ako sú TNF- α a IL-6 v rôznych typoch buniek, pôsobiac cez aktiváciu dráhy nukleárny faktor-kappa B (NF- κ B) (Jiang a kol., 2013; Zhang a kol., 2014; Jamaluddin a kol., 2012).

U zdravých ľudí sérová koncentrácia rezistínu variuje medzi 7 až 22 ng.ml⁻¹. Na rozdiel od myší, ktorých primárnym miestom produkcie rezistínu je tukové tkanivo, u ľudí je rezistín produkovaný najmä monocytmi, makrofágmi a bunkami kostnej drene, pričom tukové tkanivo sa na produkcii rezistínu podieľa minimálne (Fain a kol., 2003; Patel a kol., 2003). Hoci rezistín bol po prvý krát popísaný ako faktor prispievajúci k rozvoju inzulínovej rezistencie a diabetu mellitu u ľudí, exaktný spôsob pôsobenia rezistínu v obezite, inzulínovej senzitivite a v T2DM je náplňou štúdia.

V priebehu jeho skúmania bol rezistín spojený s rizikom rozvoja inzulínovej rezistencie, T2DM, aterosklerózy a kardiovaskulárnych chorôb, astmy, chronického zápalu čreva a

chronického ochorenia obličiek (Filková a kol., 2009; Gnacińska a kol., 2009; Jamaluddin a kol., 2012). Sérové koncentrácie rezistínu boli signifikantne zvýšené u skupín pacientov trpiacich CP, T2DM a obezitou v rôznych populáciách (Saito a kol., 2008; Furugen a kol., 2008). V gingiválnej tekutine boli výsledky nameraných koncentrácií rezistínu v rôznych štúdiách protichodné. Hiroshima a kol. (2012) nameral vyššie koncentrácie u pacientov s CP a/alebo T2DM, naopak, Zimmermann a kol. (2013) nameral nižšiu koncentráciu rezistínu u obezných pacientov s CP.

Gén pre rezistín sa nachádza na chromozóme 19. V promotorovom regióne tohoto génu sa nachádza polymorfizmus -420C/G (rs1862513), študovaný prevažne pre spojitosť s T2DM (Cho a kol., 2004; Makino a kol., 2009; Osawa a kol., 2004), obezitou (El-Shal a kol., 2013; Cho a kol., 2004) a CP (Patel a kol., 2013). Minoritná G alela tohto polymorfizmu bola asociovaná s T2DM, meta-analýza na 4555 pacientoch trpiacich T2DM a 5312 kontrolách nepreukázala spojitosť T2DM s polymorfizmom -420C/G (Wen a kol., 2013). Prehľad výsledkov asociačných štúdií rezistínu s rôznymi ochoreniami je uvedený v **tabuľke VII**.

Tabuľka VII: Rezistín – asociácie plazmatických/sérových koncentrácií a polymorfizmov s T2DM a/alebo CP a obezitou

Polymorfizmus	Citácia	Sledované ochorenia	Asociácie	Koncentrácia rezistínu v plazme/sére (ng.ml ⁻¹) GCF (ng.µl ⁻¹)
-420 C/G (rs1862513)	Cho a kol., 2004	T2DM, obezita	Alela G asociovaná s vyššími c rezistínu NS s T2DM	v plazme T2DM CC 3,77 CG 7,00 GG 9,77 Kontroly CC 2,71 CG 6,06 GG 10,26
	Suriyaprom a kol., 2009	T2DM	NS	v plazme CG/GG 3,4 CC 3,1
	Wen a kol., 2013	T2DM	NS	-
	Makino a kol., 2009	T2DM	Genotyp GG v porovnaní s CC asociovaný s nižšou c glukózy v plazme po liečbe pioglitazónom	-
	Osawa a kol., 2004	T2DM	Genotyp GG asociovaný s T2DM môže urýchliť nástup T2DM o 4,9 rokov.	-
	El-shal a kol., 2013	T2DM, obezita	Genotyp GG vyskytujúci sa s vyššou frekvenciou u obéznych pacientov (20% vs. 9,7% u kontrol) G alela asociovaná s vyšším rizikom vzniku T2DM u obéznych pacientov	v°sére CC 2,75 ± 0,75 CG 3,94 ± 1,24 GG 4,36 ± 1,8
	Chi a kol., 2009	T2DM	NS	-
	Patel a kol., 2013	CP, T2DM	c rezistínu v GCF a v sére u pacientov s CP a/alebo T2DM vyššie ako u kontrol GG genotyp asociovaný s vážnejšou formou CP GG genotyp asociovaný so zápalom parodontu a c rezistínu	v GCF T2DM + CP 10,75 ± 4,45 Kontroly 4,75 ± 1,81 CC 6,33 ± 2,87 GC 9,00 ± 3,29 GG 8,76 ± 4,78
	Tsukahara a kol., 2009	T2DM	Alela G asociovaná s vyššou c rezistínu	v°sére T2DM + CP 15,38 ± 6,8 Kontroly 8,0 ± 2,04 CC 11,40 ± 5,97 GC 14,69 ± 4,88 GG 15,06 ± 6,18

-	Furugen a kol., 2008	CP, obezita	Vyššia c rezistínu asociovaná s CP v porovnaní s kontrolami	v sére CP $6,11 \pm 0,47$; Kontroly $4,78 \pm 0,42$
-	Saito a kol., 2008	CP	Vyššia c rezistínu asociovaná s CP v porovnaní s kontrolami	v sére CP $9,9 \pm 5,0$ Kontroly $8,0 \pm 5,2$
-	Hiroshima a kol., 2012	CP, T2DM	c rezistínu v GCF vyššia u pacientov s CP a/alebo T2DM v porovnaní s kontrolami	v GCF CP $2,55 \pm 2,04$ T2DM + CP $1,84 \pm 1,97$ Kontroly $0,78 \pm 0,61$
-	Zimmermann a kol., 2013	CP, obezita	c rezistínu v sére vyššia u skupín s CP a obezitou c rezistínu v GCF nižšia u pacientov s CP a obezitou v porovnaní s kontrolami	v°sére Bez nadváhy Bez CP $1,4 \pm 0,6$ CP $2,5 \pm 1,2$ Obezita Bez CP $1,1 \pm 1,2$ CP $2,3 \pm 0,9$ v GCF Bez nadváhy Bez CP $5,58 \pm 4,63$ CP $2,04 \pm 2,79$ Obezita Bez CP $2,83 \pm 3,43$ CP $1,52 \pm 2,09$

CP=chronická parodontitída, GCF=sulkulárna tekutina, T2DM=diabetes mellitus 2. typu,
NS=nesignifikantné

6 Praktická časť

Náplňou praktickej časti diplomovej práce je vykonanie štúdií skúmajúcich ochorenia GERD, astmu a T2DM a/alebo CP, pričom študované populácie pozostávajú zo skupín pacientov trpiacich vybraným ochorením a skupiny zdravých kontrol.

Vybranými polymorfizmami sú SNPs rs1501299 a rs2241766 pre adiponektín, rs2167270 a rs13228377 pre leptín, rs1805096 pre leptínový receptor a rs1862513 pre rezistín. SNPs pre adiponektín a rezistín boli vybraté na základe rešerše pochádzajúcej z mojej bakalárskej práce (Jánoš, 2016), v ktorej boli zvolené vhodné metodiky a úspešne optimalizované pre genotypizovanie. Polymorfizmy v géne pre leptín sme vybrali na základe literárnej rešerše uvedenej v teoretickej časti tejto práce. Laboratórne práce prebehli na Ústave patologickej fyziológie, LF, MU v Brne.

6.1 Metodika

Štúdia bola uskutočnená so schválením etických komisií lekárskej fakulty Masarykovej Univerzity v Brne a Fakultnej nemocnice u Sv. Anny. Písomný informovaný súhlas bol obdržaný od všetkých účastníkov pred zaradením do štúdie, v zhode s Helsinskou deklaráciou.

Do štúdie boli prijaté iba osoby kaukazskej rasy a českého pôvodu, ktoré podpísali informovaný súhlas.

V rámci štúdií sme pracovali s DNA, ktorá bola získaná z periférnej krvi pacientov. Na princípe fenol-chloroformovej extrakcie s využitím proteinázy K a izopropanolu bola DNA izolovaná a skladovaná pri teplote -20°C .

Koncentráciu DNA sme stanovili na spektrofotometri (Nanodrop 1000, Thermo Scientific, Waltham, USA) a pri genotypizačných analýzach sme pracovali s roztokmi, v ktorých bola koncentrácia DNA vždy $50\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

6.1.1 Stanovenie genotypov pomocou PCR a reštrikčnej analýzy

Metóda PCR-RFLP (polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov, restriction fragment length polymorphism) bola optimalizovaná pre polymorfizmus rs2241766 v géne *ADIPOQ*. Zloženie reakčnej zmesi a postup sa zhoduje s optimalizovanou metodikou v BP (Jánoš 2016).

6.1.2 Stanovenia genotypov pomocou Real-time PCR

Metóda real-time PCR bola aplikovaná pri polymorfizmoch v génoch pre adiponektín, rezistín, leptín a jeho receptor. Zloženie reakčnej zmesi a postup je zhodný s metodikou optimalizovanou v BP, jedinou premennou zložkou bola sonda TaqMan® (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), ktorá bola špecifická pre každý z polymorfizmov. Ich zoznam je znázornený v Tabuľke VIII.

Tabuľka VIII: Zoznam použitých sond TaqMan

Adipocytokín	Polymorfizmus	ID sondy TaqMan
Adiponektín	rs1501299	C_7497299_10 G/T - VIC/FAM
Leptín	rs2167270	C_15966471_20 A/G - VIC/FAM
Leptín	rs13228377	C_3001672_10 A/G - VIC/FAM
Leptínový receptor	rs1805096	C_8722383_20 A/G - VIC/FAM
Rezistín	rs1862513	C_1394112_10 C/G - VIC/FAM

6.1.3 Stanovenie hladín adipocytokínov pomocou ELISA

Vzorky plazmy na stanovenie koncentrácie adipocytokínov boli izolované z vzoriek krvi subjektov a boli skladované pri teplote -80°C do dňa prevedenia experimentu. Pred experimentom boli vzorky rozmrazené a stočené (10000 RPM, 10 min, 4°C).

Na stanovenie absorbancie v závere experimentov ELISA bol použitý spektrofotometer VersaMax™ ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, United States), na vyhodnotenie kalibračnej krivky a koncentrácie vzoriek bol použitý software SoftMaxPro 4.8 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

Stanovenie koncentrácie adiponektínu

Koncentráciu adiponektínu vo vzorke krvného séra som stanovil pomocou kitu High Sensitivity Adiponectin ELISA (ID: RD191023100) (BioVendor, Brno, Česká republika).

Reakcie prebiehali v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke, jamiek so vzorkami bolo 78, zvyšných 18 jamiek bolo vyhradených pre koncentračné štandardy v duplikátoch (koncentrácie 0; 2; 5; 10; 20, 50, 100 a 150 µg.ml⁻¹) a dve kontrolné vzorky séra (výrobcom validovaná koncentrácia KS1 = 6,4 µg.ml⁻¹ a KS2 = 20,4 µg.ml⁻¹).

Postup prevedenia bol nasledovný:

1. Do príslušných jamiek mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných 100 μl štandardov, kontrol kvality (riedenie 300x) a vzoriek séra (riedenie vzoriek dilučným pufrom 300x)
2. Doska bola inkubovaná 1 hodinu (25°C), trepanie 300 ot.min^{-1} na orbitálnej trepačke (Orbit™ P4 Digital Shaker, Labnet, Edison, NJ, USA)
3. Premytie jamiek premývacím roztokom trikrát po 350 μl , zvyšky roztoku boli vyliate
4. Pipetovanie 100 μl roztoku konjugátu protilátka-chrenová peroxidáza (HRP) do každej jamky
5. Inkubácia po 1 hodinu (25°C), trepanie 300 ot.min^{-1}
6. Premytie ako v kroku 3.
7. Pipetovanie 100 μl roztoku substrátu do každej jamky
8. Inkubácia 10 minút v tme (25°C)
9. Pipetovanie 100 μl STOP-roztoku
10. Odčítaná absorbancia spektrofotometrom pri vlnovej dĺžke 450 nm do 5 minút od napipetovania STOP-roztoku. Referenčná vlnová dĺžka bola 630 nm.

Stanovenie koncentrácie leptínu

Na stanovenie koncentrácie leptínu vo vzorke séra som použil komerčne dostupný Leptin ELISA kit (ID: DEE007) (Demeditec Diagnostics, Kiel, Nemecko).

Reakcie prebiehali v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke, v 80 jamkách boli stanované koncentrácie vzoriek, zvyšných 16 jamiek bolo vyhradených pre koncentračné štandardy v duplikátoch (koncentrácie 0; 1; 10; 25; 50 a 100 ng.ml^{-1}) a dve kontrolné vzorky séra v duplikátoch (výrobcom validovaná koncentrácia $\text{KS1} = 12,1 \text{ ng.ml}^{-1}$ a $\text{KS2} = 32,2 \text{ ng.ml}^{-1}$).

Postup stanovenia:

1. Napipetovanie 100 μl dilučného pufru a 20 μl nezriedenej vzorky séra, kontrolnej vzorky, resp. štandardu, prelepenie doštičky fóliou
2. Inkubácia 1 hodinu (25°C), trepanie 350 ot.min^{-1} na orbitálnej trepačke (Orbit™ P4 Digital Shaker, Labnet, Edison, NJ, USA)
3. Vylatie obsahu jamiek a premytie vymývacím roztokom päťkrát po 300 μl , dekantácia
4. Pipetovanie 100 μl konjugátu HRP do každej jamky, prelepenie fóliou

5. Inkubácia 30 minút (25°C, 350 ot.min⁻¹)
6. Vylatie a premytie ako v kroku 3.
7. Pipetovanie 100 µl roztoku substrátu, prelepenie fóliou
8. Inkubácia 15 minút v tme (25°C)
9. Pipetovanie 100 µl STOP-roztoku (0,2 M kys. sírová, inaktivujúca peroxidázu)
10. Meranie absorbancie spektrofotometrom do 10 minút od pipetovania STOP-roztoku pri vlnovej dĺžke 450 nm. Referenčná vlnová dĺžka bola 630 nm

Stanovenie koncentrácie rezistínu

Koncentráciu rezistínu v krvnom sére som stanovil pomocou Human Resistin ELISA kitu (ID: ER1001-1) (Assaypro, St. Charles, MO, USA).

Reakcie prebiehali v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke, z ktorých 80 jamiek bolo vyhradených pre vzorky a 16 jamiek pre vzorky štandardov v duplikátoch (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 ng.ml⁻¹) slúžiacich na vytvorenie štandardnej krivky.

Postup stanovenia:

1. Napipetovanie 50 µl štandardov a vzoriek do jamiek doštičky, zalepenie fóliou
2. Inkubácia 2 hodiny (25°C)
3. Vylatie obsahu jamiek, premytie premývacím roztokom päťkrát po 200 µl, zvyšky roztoku vyliate
4. Napipetovanie 50 µl protilátky, zalepenie fóliou
5. Inkubácia 2 hodiny (25°C)
6. Vylatie a premytie ako v kroku 3.
7. Napipetovanie 50 µl konjugátu streptavidín-peroxidázy do každej jamky
8. Inkubácia 30 minút (25°C)
9. Vylatie a premytie ako v kroku 3.
10. Pipetovanie 50 µl substrátu do každej jamky
11. Inkubácia 15 minút v tme (25°C)
12. Pipetovanie 50 µl STOP-roztoku do každej jamky
13. Odčítanie absorbancie spektrofotometrom pri vlnovej dĺžke 450 nm. Referenčná vlnová dĺžka bola 570 nm

6.1.4 Štatistická analýza

Pre porovnanie kontinuálnych premenných slúžil jednoparametrový test analýzy variancie (analysis of variance, ANOVA), na posúdenie koncentrácií adipocytokínov v plazme bol

použitý neparametrický Kruskal-Wallisov test. Rozdiely vo frekvenciách alel boli testované Fisherovým exaktným testom. Distribúcie genotypov a Hardyho-Weinbergova rovnováha (HWE) boli testované χ^2 testom. Problém násobného testovania hypotéz bol korigovaný Bonferroniho korekciou. Na štatistické analýzy slúžil softvér Statistica v13.2 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

6.2 Štúdia GERD

Štúdie zameranej na GERD sa zúčastnilo spolu 399 ľudí, z toho 295 pacientov trpiacich GERD a 104 zdravých kontrol. Stanovenie diagnózy sa opieralo o klinické symptómy ako pyróza a/alebo regurgitácia kyseliny a potvrdené bolo 24 hodinovou pH metriou (meranie doby expozície ezofagu žalúdočným kyselinám), ezofagogastroduodenoskopiou (výskyt makroskopických znakov ezofagitídy) a ezofageálnou manometriou (meranie tesnosti dolného zvierača ezofagu). Navyše bola histologicky zisťovaná diagnóza Barrettovho ezofagu a infekcia baktériou *Helicobacter pylori* (Izakovicova Holla a kol., 2013).

Na základe diagnózy boli pacienti rozdelení do šiestich skupín podľa stupňa ochorenia (od neerozívnej refluxnej choroby, troch stupňov GERD podľa závažnosti, BE, až po EAC).

Stanovovanými polymorfizmami boli rs1501299 a rs2241766 nachádzajúce sa v géne *ADIPOQ*. Metódou stanovenia bola real-time PCR.

6.3 Štúdia ASTMA

Tejto štúdie sa zúčastnilo 576 ľudí, z toho 303 pacientov trpiacich astmou a 273 systémovo zdravých kontrol. Diagnóza bola stanovená na základe histórie astmatických príznakov, súčasných symptómov a znalosti o používaní liečiv proti astme. Navyše bolo vykonané klinické vyšetrenie, ktoré zahŕňalo určenie sérovej koncentrácie IgE, kožný test na zistenie reaktivity pre rôzne alergény a spirometrické stanovenie pľúcnej kapacity (Izakovicova Holla a kol., 2004). Z celkovej populácie nikto netrpel obezitou (s BMI<30).

Polymorfizmom záujmu bol SNP rs1501299 v géne *ADIPOQ* využitím metódy real-time PCR so sondou TaqMan. Okrem toho bola stanovená plazmatická koncentrácia adiponektínu pomocou metódy ELISA (High Sensitivity Adiponectin ELISA, BioVendor, Brno, Česká republika).

6.4 Štúdia T2DM a CP

Štúdie zameranej na T2DM a CP sa zúčastnilo 409 ľudí, z ktorých 205 bolo systémovo zdravých pacientov s CP, 86 subjektov tvorilo skupinu pacientov trpiacich T2DM a CP,

zvyšok tvorila skupina 118 systémovo zdravých kontrol bez CP. Pacienti boli vybratí zo súboru pacientov Parodontologického oddelenia stomatologickej kliniky vo Fakultnej nemocnici u Sv. Anny.

Diagnostika T2DM bola založená na prítomnosti klinických symptómov (polyuria, polydipsia, strata hmotnosti) a na biochemických parametroch (glykémia, glykovaný hemoglobín, ketoacidóza, stav protilátok) stanovených na Diabetologickej klinike v Brne, v zhode s všeobecne uznávanými kritériami pre diagnózu T2DM (American Diabetes Association 2016).

Diagnostika CP stavala na klinickom vyšetrení (hlbka parodontálnych chobotov, strata attachmentu - clinical attachment loss, CAL) v súlade s medzinárodne uznávanými kritériami pre klasifikáciu CP (Armitage 1999).

Kritériá pre vylúčenie zo štúdie zahŕňali diabetes (okrem skupiny T2DM a CP), ischemické choroby srdca, malígny nádor, imunodeficientné poruchy, graviditu alebo laktáciu, imunosupresiu priraditeľnú medikácii alebo liečbe akútneho ochorenia, užívanie antibiotík alebo protizápalových liekov v rozmedzí 6 týždňov priebehu štúdie, <20 zubov a neschopnosť získania informovaného súhlasu.

Analyzovaných bolo 6 polymorfizmov. Polymorfizmy rs1501299 (*ADIPOQ*), rs13228377, rs2167270 (*LEP*), rs1805096 (*LEPR*) a rs1862513 (*RETN*) boli genotypizované metódou real-time PCR so sondou TaqMan. Genotyp polymorfizmu rs2241766 (*ADIPOQ*) bol stanovovaný metódou PCR-RFLP.

Navyše bola stanovená plazmatická koncentrácia adipocytokínov adiponektínu, rezistínu a leptínu pomocou metódy ELISA (použité ELISA kity – viď kap. 6.1.3).

6.5 Výsledky

V tejto kapitole sú popísané výsledky asociačných štúdií kontrol a prípadov pre ochorenia GERD, astmu a T2DM a/alebo CP v českej populácii. Pre prehľadnosť je kapitola rozdelená do troch častí podľa študovaného ochorenia.

6.5.1 Štúdia GERD

Štúdie GERD sa zúčastnilo 399 subjektov, z toho 104 zdravých kontrol (priemerný vek $47,8 \pm 10,3$ rokov, 45% zastúpenie mužov) a 295 pacientov s GERD (priemerný vek $46,58 \pm 13,1$ rokov, 60,3% zastúpenie mužov), pričom skupina pacientov s GERD bola dodatočne rozdelená do podskupín podľa závažnosti ochorenia, viď tabuľku IX.

Genetická analýza: Nenašli sme rozdiely vo frekvenciách alel a genotypov polymorfizmov rs1501299 a rs2241766 medzi skupinami pacientov s GERD a zdravých kontrol ($P>0,05$, Tabuľka IX) a to ani po rozdelení skupiny GERD na podskupiny podľa závažnosti ochorenia.

Tabuľka IX: Skupina GERD, rozdelenie do podskupín podľa závažnosti ochorenia, genotypové frekvencie a frekvencia minoritných alel v *ADIPOQ* u HC a GERD pacientov

Katégoria GERD	N (295)	Polymorfizmus	Genotyp	HC N=104 (%)	MAF u HC (%)	GERD N=295 (%)	MAF u GERD (%)
NERD	96	ADIPOQ rs2241766 (+45T/G)	TT	89 (85,6)	7,2	247 (83,7)	8,1
			GT	15 (14,4)		48 (16,3)	
esofagititis 1.stupňa	40		GG	0		0	
esofagititis 2. stupňa	59						
esofagititis 3-stupňa	35	ADIPOQ rs1501299 (+276G/T)	GG	50 (48,1)	30,8	134 (45,4)	32,2
			GT	44 (42,3)		132 (44,8)	
BE	53		TT	10 (9,6)		29 (9,8)	
EAC	12						

BE=Barretov ezofagus, EAC=adenokarcinóm ezofagu, GERD=gastroezofageálna refluxná choroba, HC=zdravé kontroly, MAF=frekvencia minoritnej alely, N=počet, NERD=neerozívna refluxná choroba

6.5.2 Štúdia ASTMA

Pacienti: Štúdie zameranej na astmu sa zúčastnilo 576 ľudí, z toho 303 pacientov trpiacich astmou a 273 systémovo zdravých kontrol.

Genetická analýza: Nositelia genotypu GG mali oproti osobám s genotypmi GT a TT vyššie riziko rozvoja astmy ($P<0,001$, OR=1,88, 95%CI: 1,35-2,63, Tabuľka X).

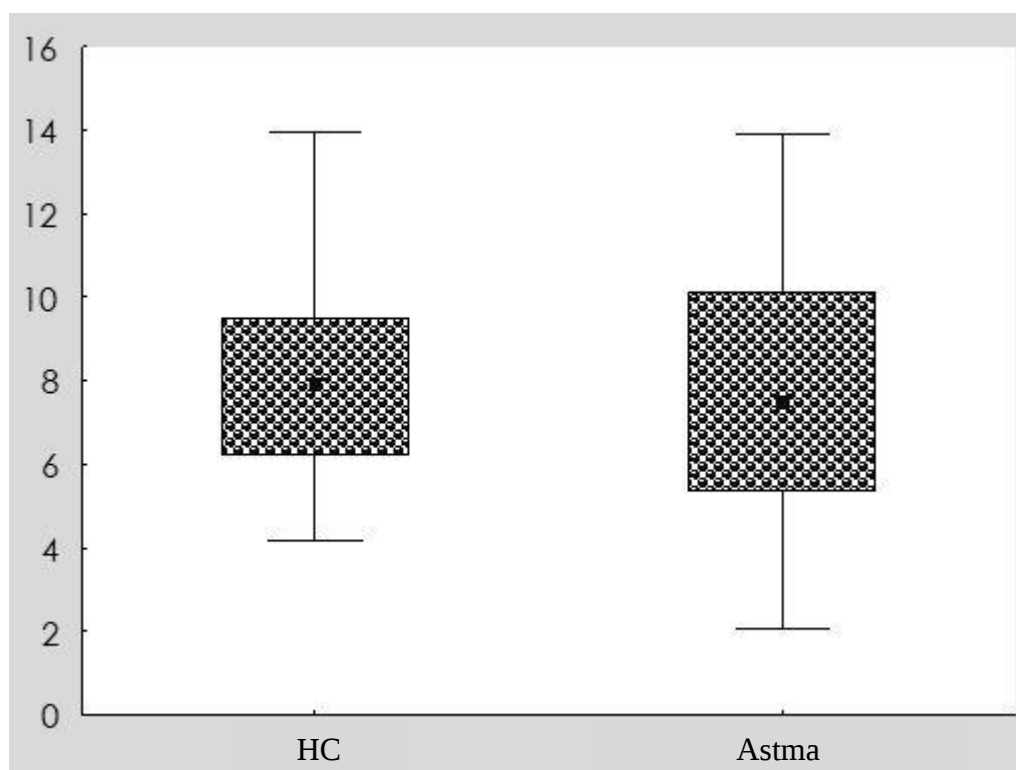
Analýza plazmatických hladín: Koncentrácia adiponektínu v plazme bola bez signifikantných rozdielov u oboch skupín kontrol a pacientov ($P>0,05$), nesignifikantné boli aj rozdiely hladín adiponektínu v závislosti na genotype rs1501299 (*ADIPOQ*) ($P>0,05$, Obrázok 1 a 2).

Tabuľka X: Skupina ASTMA, genotypové frekvencie a frekvencia minoritnej alely u skupín astmatikov a zdravých kontrol

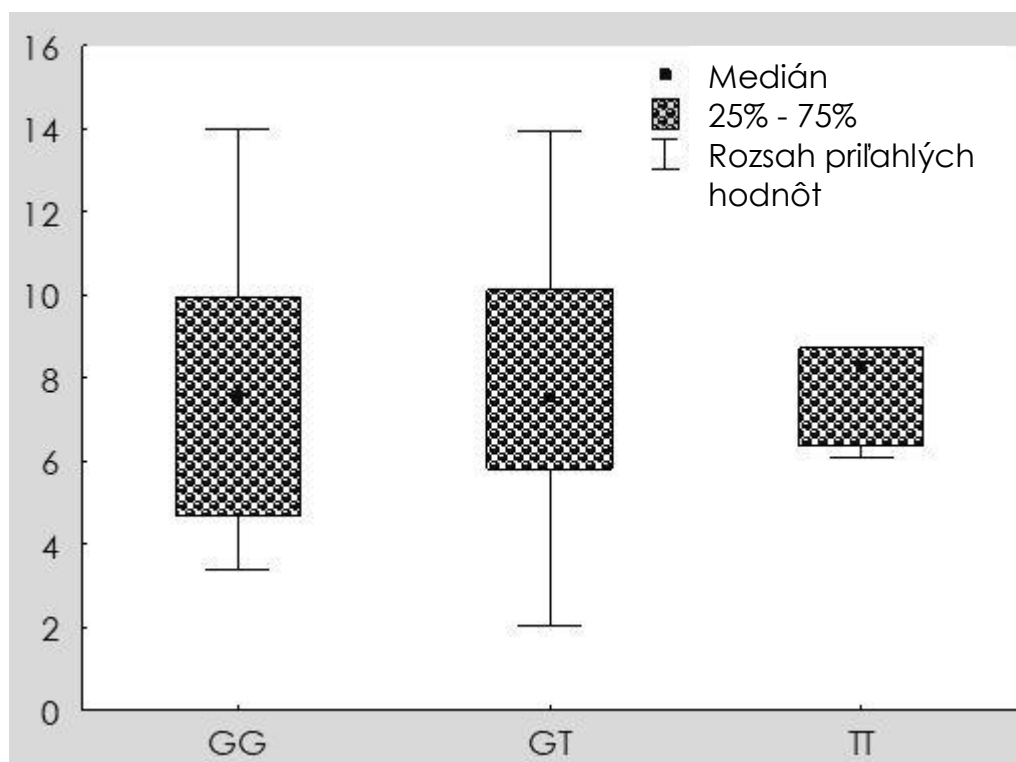
Polymorfizmus	Genotyp	HC N=273 (%)	MAF u HC (%)	Pacienti ASTMA N=303 (%)	MAF u ASTMA (%)
<i>ADIPOQ</i>	GG	106 (38,8)	36,4	165 (54,4)	25,9
rs1501299	GT	135 (49,5)		119 (39,3)	
(+276G/T)	TT	32 (11,7)		19 (6,3)	
	GT+GG	241 (88,3)		284 (93,7)*	

MAF=frekvencia minoritnej alely, HC=zdravé kontroly, N=počet

* $P<0,001$



Obrázok 1: Plazmatické koncentrácie adiponektínu [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]



Obrázok 2: Plazmatické koncentrácie [$\mu\text{g.ml}^{-1}$] adiponektínu podľa genotypu rs1501299

6.5.3 Štúdia T2DM a CP

Pacienti: Štúdie zameranej na T2DM a CP sa zúčastnilo 409 ľudí, z ktorých 205 bolo systémovo zdravých pacientov s CP, 86 subjektov tvorilo skupinu pacientov trpiacich T2DM a CP (T2DM+CP), zvyšok tvorila skupina 118 systémovo zdravých kontrol bez CP.

Klinická analýza: Kým zastúpenie pohlaví vo všetkých skupinách bolo rovnomerné, priemerný vek bol odlišný u skupín T2DM+CP alebo CP a skupiny HC ($P<0,01$ alebo $P<0,05$), demografické údaje sú znázornené v tabuľke XI. Pacienti s T2DM trpeli týmto ochorením v priemere 9,4 roka ($\pm 7,0$ štandardná odchýlka SD). Index telesnej hmotnosti (BMI) bol zistený najvyšší v skupine T2DM+CP (30 kg/m^2) v porovnaní s $23,4 \text{ kg/m}^2$ u kontrol alebo $25,5 \text{ kg/m}^2$ u pacientov s CP ($P<0,01$). Parodontálne ukazatele - hĺbka parodontálnych chobotov a strata attachmentu – boli signifikantne vyššie v skupine T2DM+CP aj v skupine CP v porovnaní s kontrolami ($P<0,001$).

Tabuľka XI: Demografické údaje u skupín pacientov s CP, T2DM+CP a zdravých kontrol

Charakteristika	HC	CP	T2DM+CP
<i>priemer$\pm$SD</i>			
<i>medián [IQR]</i>	N=118	N=205	N=86
Vek (roky)	48,3 $\pm$ 10,8	55,5 $\pm$ 9,8	67,9 $\pm$ 9,3*
Pohlavie (muži, %)	44,9	39,5	50,0
BMI (kg/m²)	23,4 [18,8-28,0]	25,5 [23,4-29,3]	30,1 [26,8-33,1]*
PD (mm)	0,4 [0,2-0,6]	3,0 [2,8-3,7]*	3,6 [3,2-4,4]* #
CAL (mm)	0,5 [0,3-0,75]	4,0 [3,1-4,4]* #	4,7 [4,1-5,6]* #

CAL=strata attachmentu, BMI=index telesnej hmotnosti, CP=chronická parodontitída, HC=zdravé kontroly bez systemických ochorení a chronickej parodontitídy, IQR=medzikvartilové rozpätie, N=počet, PD=hĺbka parodontálnych chobotov, SD=smerodajná odchýlka, T2DM=diabetes mellitus 2. typu

* $P<0,01$ v porovnaní s HC, # $P<0,01$ v porovnaní so skupinou CP

Genetická analýza: Všetky študované polymorfizmy boli v HWE v skupine zdravých kontrol ($P>0,05$). Nositelia genotypu TT v porovnaní s osobami nesúcimi genotypy GG + GT polymorfizmu rs2241766 (*ADIPOQ*) mali nižšie riziko rozvoja CP ($P<0,01$). V porovnaní skupiny T2DM+CP so skupinou kontrol a skupinou CP neboli objavené signifikantné rozdiely v alelových alebo genotypových frekvenciách. Pri porovnaní skupiny

CP so skupinou kontrol bol výskyt genotypu TT polymorfizmu rs2241766 (*ADIPOQ*) menej častý v skupine CP, ako v skupine kontrol ($P=0,030$).

Pri polymorfizmoch rs1501299 (*ADIPOQ*), rs13228377, rs2167270 (*LEP*), rs1805096 (*LEPR*) a rs1862513 (*RETN*) neboli objavené signifikantné rozdiely v alelových ani genotypových frekvenciách medzi skúšanými skupinami ($P>0,05$) (Tabuľka XII).

Analýza plazmatických hladín: Plazmatické koncentrácie adipocytokínov boli zmerané u 20 kontrol, 22 CP pacientov a 37 pacientov zo skupiny T2DM+CP. Žiadne signifikantné rozdiely plazmatických koncentrácií adiponektínu, leptínu a rezistínu medzi študovanými skupinami neboli objavené, avšak medián koncentrácie adiponektínu ($P=0,056$) a pomer hladín leptínu k adiponektínu ($P=0,054$) bol marginálne asociovaný s T2DM+CP. (Obr. 3 a 4).

Tabuľka XII: Genotypové frekvencie a frekvencia minoritných alel génových polymorfizmov v *ADIPOQ*, *LEP*, *LEPR* a *RETN* u systémovo zdravých kontrol s CP, pacientov s T2DM a CP a zdravých kontrol bez CP

Polymorfizmus	Genotyp	HC N=118 (%)	χ^2	P pre HWE u HC [†]	Pacienti s CP N=205 (%)	P ^{a††}	Pacienti s T2DM+CP N=86 (%)	P ^{a††}	P ^{b††}
<i>ADIPOQ</i> rs2241766 (+45T/G)	TT	105 (89,0)	0,417	0,518	160 (78,0)	0,030	71 (82,6)	0,188	0,361
	TG	13 (11,0)			41 (20,0)		15 (17,4)		
	GG	0 (0,0)			4 (2,0)		0 (0,0)		
	GG+TG	13 (11,0)			44 (22,0)		15 (17,4)		
<i>ADIPOQ</i> rs1501299 (+276G/T)	GG	56 (47,5)	0,425	0,837	106 (51,7)	0,429	39 (45,3)	0,626	0,611
	GT	50 (42,4)			86 (42,0)		41 (47,7)		
	TT	12 (10,2)			13 (6,3)		6 (7,0)		
<i>LEP</i> rs13228377 (3'UTR A/G)	AA	29 (24,6)	2,898	0,089	58 (28,3)	0,514	25 (29,1)	0,684	0,960
	AG	66 (55,9)			101 (49,3)		43 (50,0)		
	GG	23 (19,5)			46 (22,4)		18 (20,9)		
<i>LEP</i> rs2167270 (+19A/G)	GG	42 (35,6)	3,450	0,063	72 (35,1)	0,217	34 (39,5)	0,599	0,629
	GA	63 (53,4)			96 (46,8)		40 (46,5)		
	AA	13 (11,0)			37 (18,1)		12 (14,0)		
<i>LEPR</i> rs1805096 (+384A/G, P1019P)	GG	47 (39,8)	0,001	0,986	82 (40,0)	0,393	30 (34,9)	0,713	0,170
	GA	55 (46,6)			84 (41,0)		45 (52,3)		
	AA	16 (13,6)			39 (19,0)		11 (12,8)		
<i>RETN</i> rs1862513 (-420C/G)	CC	55 (46,6)	0,002	0,966	99 (48,3)	0,958	48 (55,8)	0,371	0,417
	CG	51 (43,2)			86 (41,9)		29 (33,7)		
	GG	12 (10,2)			20 (9,8)		9 (10,5)		

ADIPOQ=adiponektín, CP=chronická parodontitída, HC=zdravé kontroly bez CP, HWE=Hardy-Weinbergova rovnováha LEP=leptín, LEPR=leptínový receptor, N=počet, RETN=rezistín, T2DM=diabetes mellitus 2. typu

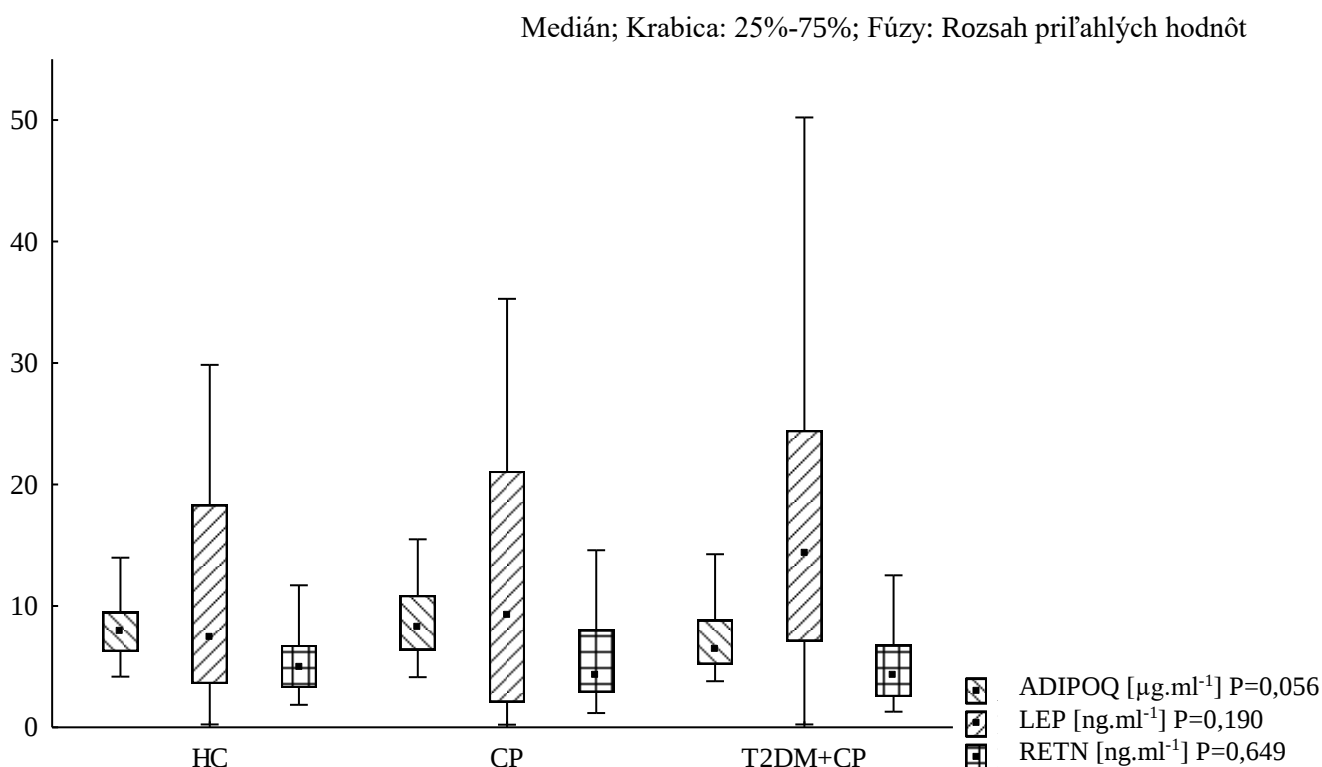
^a v porovnaní s HC, ^b v porovnaní s CP pacientmi, * $P<0,01$

[†]Analýza bola vykonaná pomocou χ^2 testu.

^{††}Porovnania boli vykonané Fisherovým exaktným testom

Analýza hladín podľa pohlavia ukázala marginálne nižšiu koncentráciu ADIPOQ v plazme u žien s T2DM+CP v porovnaní s kontrolami a skupinou žien trpiacich CP (medián [medzikvartilové rozpätie], T2DM+CP 7,1 [5,2-8,8] $\mu\text{g.ml}^{-1}$; HC (9,1 [7,8-13,8] $\mu\text{g.ml}^{-1}$; CP (9,8 [7,8-12,3] $\mu\text{g.ml}^{-1}$, $P=0,053$).

Nakoniec, plazmatické koncentrácie adipocytokínov boli analyzované podľa BMI. Pacienti boli rozdelení do troch podskupín: normálna váha ($\text{BMI}<25 \text{ kg.m}^{-2}$), nadváha ($25\leq\text{BMI}<30 \text{ kg.m}^{-2}$) a obezita ($\text{BMI}\geq 30 \text{ kg.m}^{-2}$). Hoci u adiponektínu ani rezistínu neboli objavené žiadne rozdiely koncentrácií medzi podskupinami, u leptínu bol signifikantne zvýšený medián koncentrácie v podskupine obéznych ľudí (19,6 [12,0-33,4] ng.ml^{-1}) v porovnaní

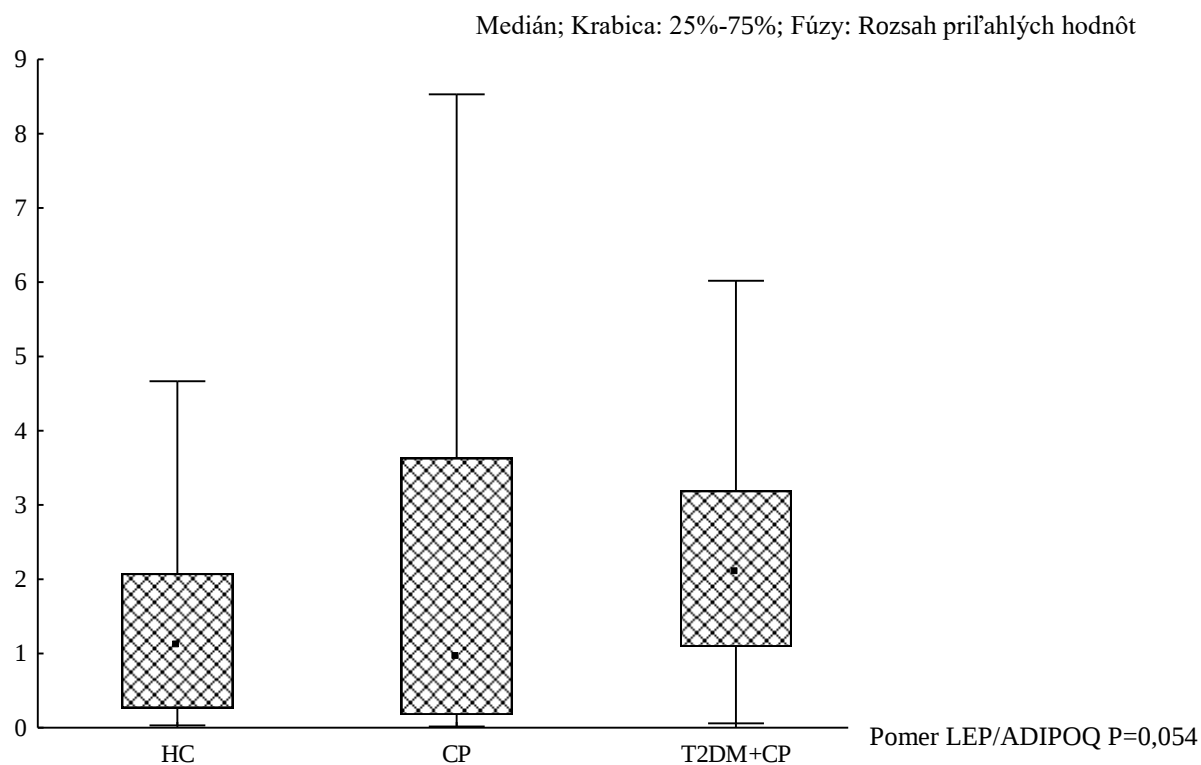


Obrázok 3: Plazmatické koncentrácie adiponektínu, leptínu a rezistínu u 80 subjektov (20 systémovo zdravých pacientov s CP, 37 pacientov s T2DM a CP a 23 zdravých kontrol -HC). Porovnania boli vykonané Kruskal-Wallisovým testom.

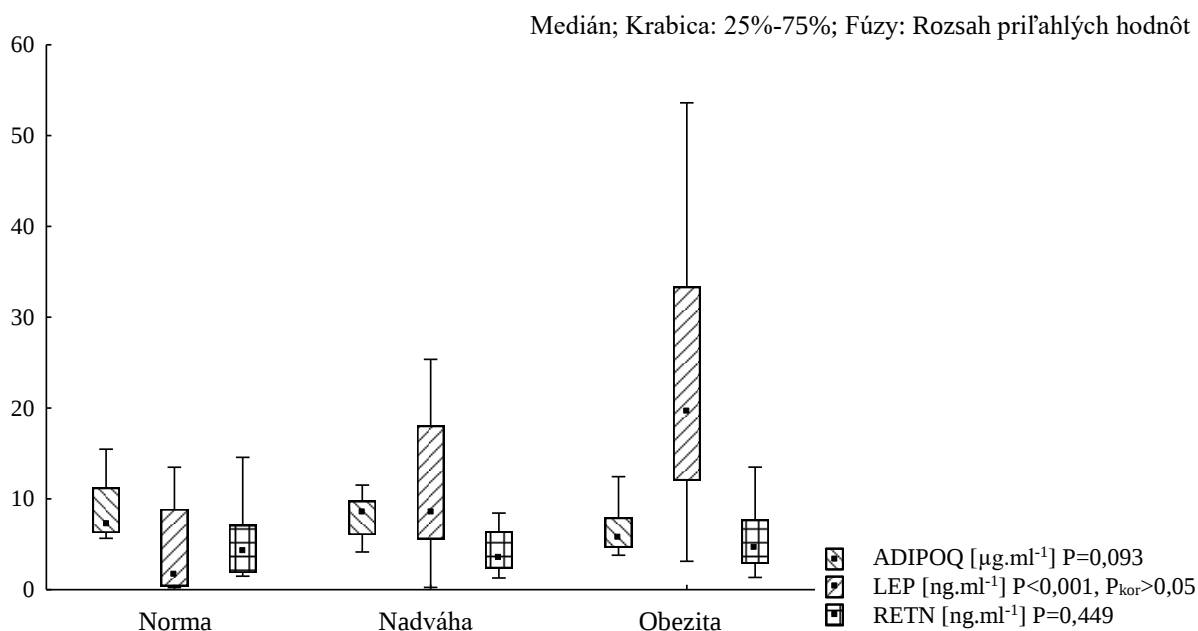
s podskupinami ľudí s nadváhou (8,5 [5,6-15,6] ng.ml^{-1}) a s normálnou váhou (1,9 [0,4-9,1] ng.ml^{-1} , $P<0,05$; $P<0,01$ Obr. 5). Podobne aj medián pomeru leptínu ku adiponektínu bol zistený najvyšší v podskupine obéznych ľudí ($P<0,01$, Obr. 6).

V podskupine $\text{BMI}<25 \text{ kg.m}^{-2}$, pacienti T2DM+CP (7,9 [1,6-25,1] ng.ml^{-1}) mali marginálne vyšší medián plazmatickej koncentrácie leptínu v porovnaní so skupinou kontrol (0,4 [0,3-8,9] ng.ml^{-1}) ($P=0,073$), podobne v rovnakej podskupine, medián pomeru leptínu ku

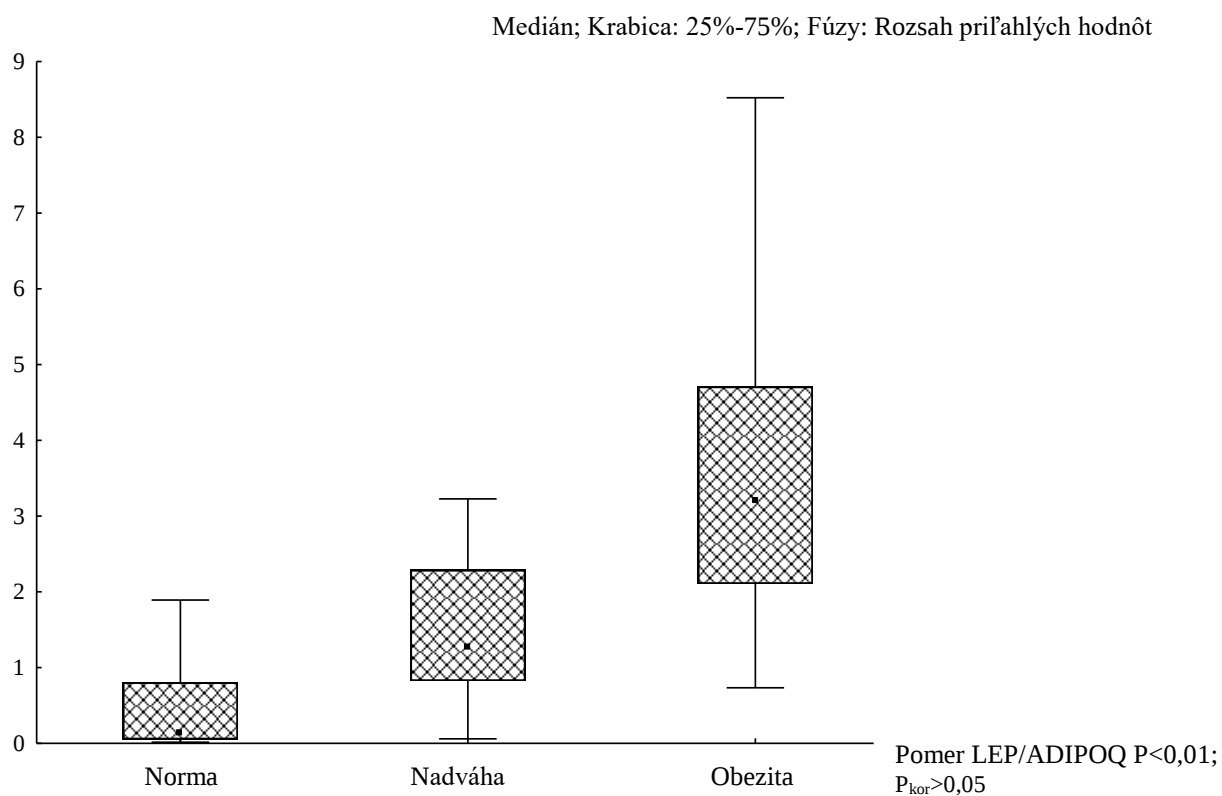
adiponektínu bol signifikantne asociovaný (0,16 [0,05-1,14] u T2DM+CP vs. 0,06 [0,04-0,81] u skupiny CP, $P=0,035$).



Obrázok 4: Pomer koncentrácií LEP/ADIPOQ u 80 subjektov (20 systémovo zdravých pacientov s CP, 37 pacientov s T2DM a CP a 23 zdravých kontrol - HC). Porovnania boli vykonané Kruskal-Wallisovým testom.



Obrázok 5: Plazmatické koncentrácie adiponektínu, leptínu a rezistínu u 80 subjektov rozdelených do troch skupín podľa BMI indexu. Porovnania boli vykonané Kruskal-Wallisovým testom. Bonferroniho korekcia bola vykonaná (P_{kor})



Obrázok 6: Pomer koncentrácií LEP/ADIPOQ u 80 subjektov rozdelených do troch skupín podľa BMI. Porovnania boli vykonané Kruskal-Wallisovým testom. Bonferroniho korekcia bola vykonaná (P_{kor})

Hodnoty koncentrácií plazmatických hladín adipocytokínov boli nezávislé na genotypoch polymorfizmov v *ADIPOQ*, *LEP*, *LEPR* a *RETN* ($P>0,05$, tabuľka XIII).

Tabuľka XIII: Vybrané polymorfizmy a plazmatické koncentrácie adipocytokínov u 80 subjektov (20 systémovo zdravých pacientov s CP, 37 pacientov s T2DM+CP a 23 zdravých kontrol -HC)

Polymorfizmus	Genotyp	N	Plazmatická konc. medián [IQR]	Hodnota P
ADIPOQ μg.ml ⁻¹				
ADIPOQ	TT	67	7,78 [5,70-9,95]	0,224
rs2241766	TG	12	6,09 [5,54-8,20]	
(+45G/T)	GG	1	10,51 [10,51-10,51]	
ADIPOQ	GG	34	7,53 [5,66-9,42]	0,946
rs1501299	GT	41	7,41 [5,71-10,51]	
(+276G/T)	TT	5	7,13 [6,38-8,15]	
LEP ng.ml ⁻¹				
LEP	AA	22	9,12 [5,46-15,58]	0,408
rs13228377	AG	45	12,35 [5,03-19,62]	
(3'UTR A/G)	GG	13	15,48 [6,96-26,21]	
LEP	GG	33	8,88 [5,46-21,11]	0,225
rs2167270	GA	39	12,88 [4,55-25,36]	
(+19A/G)	AA	8	18,40 [10,23-27,16]	
LEPR	GG	26	8,04 [2,39-14,61]	1,000
rs1805096	GA	44	14,44 [7,65-25,41]	
(+384A/G,P1019P)	AA	10	9,71 [1,95-15,58]	
RETN ng.ml ⁻¹				
RETN	CC	41	3,64 [2,35-6,79]	0,117
rs1862513	CG	27	4,88 [3,25-6,57]	
(-420C/G)	GG	12	6,25 [3,64-8,30]	

ADIPOQ=adiponektín, CP=chronická parodontitída, HC=zdravé kontroly bez CP, IQR=medzikvartilové rozpätie, LEP=leptín, LEPR=leptínový receptor, N=počet, RETN=rezistín, T2DM=diabetes mellitus 2. typu

6.6 Diskusia

6.6.1 Štúdia GERD

Hoci ochorenie GERD patrí medzi časté chronické zápalové ochorenia, v súvislosti s adipocytokínmi, ktoré pôsobia ako mediátory zápalu, neboli z pohľadu genetickej variability zatiaľ detailne skúmané.

Polymorfizmus rs1501299 génu *ADIPOQ* bol s ďalšími kandidátnymi génmi obezity skúmaný vedeckou skupinou Doecke a kol., (2008), na početnej skupine 260 pacientov trpiacich EAC a vyše 1300 kontrol, tento výskum však nepreukázal signifikantnú asociáciu

polymorfizmu rs1501299 s EAC, čo koreluje s našimi výsledkami. Ani ďalšie formy GERD neboli s polymorfizmom rs1501299 v českej populácii asociované.

Pokiaľ je nám známe, na základe rešerše vedeckých článkov venujúcim sa GERD a polymorfizmom v *ADIPOQ*, zatiaľ neexistujú štúdie venujúce sa polymorfizmu rs2241766 v spojitosti s ochorením GERD. V našej štúdii sme nepreukázali významnú asociáciu medzi rs2241766 a výskytom ochorenia GERD. Táto štúdia je prvou prácou zaoberajúcou sa polymorfizmami v géne *ADIPOQ* v súvislosti s GERD v českej populácii.

Koncentrácie adiponektínu boli merané vo vzťahu k GERD vo viacerých štúdiách, avšak s kontroverznými výsledkami (Greer a kol., 2015; Rubenstein a kol., 2008; Tseng a kol., 2015; Rubenstein a kol., 2009; Kendall a kol., 2007; Garcia a kol., 2014; Almers a kol., 2015). Meranie a analýza plazmatickej koncentrácie adiponektínu u pacientov s GERD by preto mohlo byť pokračovaním nášho štúdia pre ucelenejší prehľad o vzťahu adiponektínu a GERD.

6.6.2 Štúdia ASTMA

Štúdium vzťahu astmy a adipocytokínov patrí medzi zatiaľ málo preskúmané vedecké oblasti. Článok od Greenberga a kol., (2006) popisuje funkciu adipózneho tkaniva ako endokrinného orgánu a vplyv adipocytokínov na chronický zápal. Rizikovou je podľa neho rola obezity v chronických ochoreniach, medzi ktoré radí aj astmu. Článok od Fantuzzi (2005) okrem funkcie tukového tkaniva popisuje aj rolu adipocytokínov v astme, avšak pripúšťa aj ďalšie rizikové faktory (napr. dietárne a environmentálne faktory), ktoré môžu skresľovať výsledky štúdií. Tým otvára diskusiu a vyjadruje potrebu ďalšieho výskumu pre lepší náhľad do problematiky.

Výsledky genetickej štúdie ukázali silnú asociáciu genotypu GG s výskytom astmy oproti genotypom GT a TT. Polymorfizmus rs1501299 je zámenou T alely namiesto alely G v intróne 2 génu *ADIPOQ* (+276G/T) a hoci jeho funkcia zatiaľ nebola objasnená, predpokladá sa, že pôsobí ako marker iného polymorfizmu, ovplyvňujúceho expresiu génu *ADIPOQ* (Menzaghi a kol., 2004). Podľa rešerše spomínanej v teoretickej časti práce jedinou štúdiou skúmajúcou polymorfizmus rs1501299 v géne *ADIPOQ* bola práca od Ding a kol., (2015), ktorá na regionálnej homogénnej čínskej populácii o veľkosti 120 pacientov a 120 kontrol asociovala polymorfizmus rs1501299 s exacerbáciou astmy a tiež spojila výskyt genotypu TT s rizikom astmy ($P=0,023$). Táto populácia má vyšší výskyt astmy v porovnaní s ostatnou čínskou populáciou.

Štúdie venujúce sa korelácii hladín adiponektínu, najhojnejšie zastúpeného adipocytokínu, asociovali nižšie koncentrácie protizápalovo pôsobiaceho adiponektínu s astmou u detí v porovnaní so zdravými kontrolami (Ozde a kol., 2015), navyše, obezita u detí rezultovala v ešte nižšej koncentrácii sérového adiponektínu (Baek a kol., 2011). U žien v strednom veku podľa Sooda a kol., (2012) nižšia koncentrácia adiponektínu indikovala vyššie riziko pre rozvoj astmy, hlavne u fajčiarok, avšak koncentrácia adiponektínu nezávisela na BMI pacientov. V kontraste so spomenutými výsledkami sú výsledky našej štúdie kontrol a prípadov, v ktorej neboli preukázané rozdiely v koncentrácii adiponektínu u astmatikov (7,6 [4,7-10,5] $\mu\text{g.ml}^{-1}$) a kontrol (8,7 [5,6 -11,8] $\mu\text{g.ml}^{-1}$, $P>0.05$). Je však vidieť klesajúci trend koncentrácie adiponektínu u astmatikov. Podobný výsledok bez rozdielu koncentrácií adiponektínu medzi skupinou astmatikov a kontrol zaznamenal Tsaroucha a kol., (2013), ktorý ale vďaka dobre zaznamenanému priebehu astmy rozdelil astmatikov na miernejšiu a vážnejšiu variantu podľa početnosti akútnych astmatických záchvatov, následne asocioval nižšie koncentrácie adiponektínu s vážnou formou astmy v porovnaní s miernou formou astmy. Bez asociácie medzi celkovou koncentraciou adiponektínu a astmou v japonskej populácii, podobne ako pri našich výsledkoch, bola uzavretá štúdia od Hayashikawa a kol., (2015). Okrem celkového adiponektínu bola však zameraná aj koncentrácia nízko-, stredne- a vysokomolekulárnych izoform, kde sa už preukázal signifikantný rozdiel koncentrácií nízkomolekulárneho adiponektínu medzi skupinami astmatikov a kontrol. Vzhľadom k obmedzenému počtu stanovených subjektov v našej štúdii (46 astmatikov a 25 kontrol) by rozdelenie skupiny astmatikov na podkategórie viedlo k ochudobneniu a strate štatistickej sily testu, navyše, ELISA kit použitý v našej štúdii slúžil iba na stanovenie koncentrácie celkového adiponektínu.

Podľa našich znalostí je táto práca prvou štúdiou zaoberajúcou sa polymorfizmom v géne *ADIPOQ* a astmou v kaukazskej populácii. Silná asociácia genotypu GG s astmou a opačné výsledky štúdie vykonanej na čínskej populácii názorne ukazujú potrebu ďalšieho výskumu pre objasnenie role polymorfizmu rs1501299 v astme.

6.6.3 Štúdia T2DM a CP

Hoci spojenie medzi T2DM, CP a obezitou nie je zatiaľ úplne vysvetlené (Winning a kol., 2017), adipocytokíny sú považované za spojenie medzi parodontitídou a systemickými ochoreniami z dôvodu ich vplyvu na priebeh zápalu. Rola najznámejších adipocytokínov v patogenéze parodontitídy u diabetikov bola popísaná v prehľadovom článku od Ogawa a

kol., (2014), navyše, vplyv obezity na koncentrácie adipocytokínov podporujúcich zápal parodontu nezávisle na parodontálnej liečbe pozoroval Goncalves a kol. (2015).

V štúdií T2DM a CP, jediným polymorfizmom so zistenou signifikantnou asociáciou bola mutácia rs2241766 génu *ADIPOQ*. Genotyp TT tohto polymorfizmu bol oproti genotypom GT a GG signifikantne menej zastúpený u skupiny CP ($P < 0,01$). Hoci v porovnaní skupiny T2DM+CP s kontrolami alebo skupinou CP signifikantný rozdiel vo frekvencii genotypu TT zistený nebol, tak v prípade porovnania skupiny CP a zdravých kontrol sa opakoval zriedkavejší výskyt genotypu TT v skupine CP ($P < 0,030$). Polymorfizmus rs2241766 je lokalizovaný na nukleotide +45T/G v exóne 2 génu *ADIPOQ*. Zámena guaninu za thymin v sekvencii DNA vedie k tichej mutácii Gly15Gly. Hoci nedochádza k zámene aminokyselín v sekvencii vzniknutého proteínu, môže tento polymorfizmus, nachádzajúci sa blízko hranice intrónu a exónu (Takahashi a kol., 2000), ovplyvniť splicing mRNA vzniknutej po transkripcii (Cartegni a kol., 2002). Podľa štúdie od Yang a kol. (2003), koncentrácie mRNA v omentálnom tukovom tkanive obsahujúce G alelu (rs2241766) boli vyššie v porovnaní s mRNA nesúcou alelu T. Napriek tomu, priemerná plazmatická koncentrácia adiponektínu bola podobná medzi pacientmi s rôznymi genotypmi polymorfizmu rs2241766 (Takahashi a kol., 2000). V zhode s týmito výsledkami, žiadna signifikantná asociácia medzi koncentráciou adiponektínu a variantami polymorfizmu rs2241766 nebola objavená ani v našej štúdií. Usudzujeme, že asociácia medzi rs2241766 a CP môže byť následkom väzby medzi týmto polymorfizmom a inej génovej varianty s funkčným vplyvom a preto je potrebný ďalší výskum.

V minulosti (Phillips a kol., 2010) bola potvrdená nižšia koncentrácia adiponektínu a expresia génu *ADIPOQ* z dôvodu chronického zápalu a oxidatívneho stresu v obezite. Navyše, vysoký pomer leptínu k adiponektínu môže byť dôležitým znakom vysokého rizika rozvoja abdominálnej obezity (Engin, 2017). Leptín, kódovaný génom obezity, interaguje s receptorom, kódovaným génom *LEPR*, čo vedie k regulácii apetítu, výdaja energie a možnému utlmeniu zápalu adipózneho tkaniva. To poukazuje na rolu leptínu jednak v metabolizme, ako aj v imunitnom systéme. Prehľadový článok od Pérez-Pérez a kol., (2017) preto navrhuje LEP a LEPR ako indikátor zápalu a aktivácie systémov nešpecifickej imunity a ako možné miesto liečebnej intervencie. Štúdia podľa Nokhbehsaim, a kol., (2014) preukázala negatívny vplyv leptínu na regeneráciu parodontálnych väzivových buniek, načrtávajú tak patomechanistické prepojenie medzi obezitou a zhoršenou liečbou parodontu. Koncentrácia plazmatického leptínu bola

signifikantne zvýšená u pacientov s agresívnou parodontitídou v porovnaní so zdravými kontrolami v čínskej populácii (Shi a kol., 2015). Preto Khorsand a kol., (2016) navrhol meranie koncentrácie leptínu v slinách ako jednoduchú neinvazívnu metódu na stanovenie rizika náchylnosti k parodontitíde.

Meta-analýza od Zhu a kol., (2017) potvrdila prevažujúce zvýšené sérové koncentrácie leptínu a znížené sérové koncentrácie adiponektínu u CP pacientov v porovnaní so zdravými kontrolami v podskupine BMI<30. U systémovo zdravých pacientov s CP sa sérové koncentrácie leptínu a adiponektínu nemenia signifikantne po parodontálnej liečbe. Kardeşler a kol., (2010) analyzoval koncentrácie adipocytokínov u pacientov s T2DM a CP a objavil následné zníženie konc. leptínu a zvýšenie koncentrácie adiponektínu po parodontálnej liečbe. Podobné výsledky zaznamenal aj Wang a kol., (2017), ktorý našiel zmeny v sérovej koncentrácii adiponektínu po liečbe v skupine T2DM+CP.

Podobne ako u Sete a kol. (2015) a Mendoza-Azpur a kol. (2015), v tejto štúdii neboli nájdené signifikantné rozdiely v koncentráciách adiponektínu, leptínu alebo rezistínu medzi skupinami CP a HC. Avšak, dá sa pozorovať tendencia k nižšej plazmatickej koncentrácii adiponektínu a vyššiemu pomeru leptínu k adiponektínu u skupiny T2DM+CP. Navyše, po rozdelení účastníkov štúdie podľa BMI, skupina s normálnou váhou mala marginálne zvýšenú plazmatickú koncentráciu leptínu u skupiny T2DM+CP v porovnaní s CP a z toho rezultujúce rozdiely v mediáne pomeru leptínu k adiponektínu medzi rovnakými skupinami. Podľa našich výsledkov, rozhodujúci vplyv na koncentrácie adipocytokínov tak môže mať diabetický status nezávisle na váhe pacienta.

Nezávisle na parodontálnom statuse, plazmatická koncentrácia leptínu bola signifikantne vyššia v skupine obéznych pacientov v porovnaní so skupinami s nadváhou a normálnou váhou a takisto medián pomeru koncentrácie leptínu k adiponektínu bol v našej štúdii najvyšší v podskupine obéznych pacientov. Tieto pozorovanie sú v súlade s výsledkami prezentovanými López-Jaramillo a kol., (2014).

Naše výsledky sú v kontraste so štúdiami zameranými na variabilitu v génoch *ADIPOQ* a *RETN* u pacientov s CP a T2DM/obezitou (Damrongrungruang a kol., 2015; Patel a kol., 2013). Rôzne výsledky môžu byť spôsobené inter-individuálnou variabilitou medzi populáciami. V prípade polymorfizmu rs2241766 (*ADIPOQ*), frekvencia minoritnej G alely (minor allele frequency, MAF) v českej populácii je 8,4 %, zatiaľ čo MAF japonskej populácie podľa štúdie (Damrongrungruang a kol., 2015) bola 31,4 %. Frekvencie tejto aj našej štúdie sú v zhode s frekvenciami pre európsku a východoázijskú populáciu podľa

databázy polymorfizmov národného centra biotechnologických informácií (National Center or Biotechnology Information, NCBI). Druhým dôvodom pre rozdiely medzi závermi môže byť v niektorých prípadoch množstvo subjektov prijatých do štúdií, obzvlášť v skupine pacientov. Iba 43 pacientov s T2DM a CP bolo vybratých v japonskej predbežnej štúdií (Damrongrungruang a kol., 2015) a analýza génu RETN prebehla u 90 indických pacientov (Patel a kol., 2013) rozdelených do 3 podskupín (bez obezity a bez CP, bez obezity s CP, obezity s CP), čím sa mohla limitovať štatistická sila štúdií.

Hlavnou limitáciou našej štúdie bola neprítomnosť podskupiny T2DM bez parodontitídy, vzhľadom na fakt, že všetci zúčastnení diabetici trpeli miernejšou alebo vážnejšou formou CP. Na druhej strane, veľkosť populácie (N=409) bola niekoľkokrát väčšia ako populácie štúdií venujúcich sa T2DM pacientov so známym parodontálnym statusom (Damrongrungruang a kol., 2015; Patel a kol., 2013). Naša štúdia ako prvá popisuje danú problematiku v kaukazskej populácii, navyše môžeme predpokladať vysokú homogenitu nami vybratej populácie, vzhľadom na výber subjektov z poolu pacientov českého pôvodu z oblasti južnej Moravy. Okrem genetickej analýzy sme analyzovali aj plazmatické koncentrácie troch adipocytokínov, z finančných dôvodov žiaľ nebolo možné stanoviť okrem plazmatických hladín aj koncentráciu adipocytokínov v slinách. Tak či tak, ďalší výskum je potrebný pre vysvetlenie asociácie medzi polymorfizmami v adipocytokínoch a CP/T2DM+CP a vzťahu medzi koncentraciami adipocytokínov a spomenutými ochoreniami v rôznych populáciách.

7 Súhrn

Dané ciele diplomovej práce boli splnené, v teoretickej časti na základe rešerše štúdií venujúcich sa variabilite génov pre adipocytokíny v zápalových ochoreniach GERD, astme, T2DM a/alebo CP bolo vybratých 6 polymorfizmov v génoch *ADIPOQ*, *LEP*, *LEPR* a *RETN* pre asociačnú štúdiu kontrol a prípadov v českej populácii. Pomocou optimalizovaných metodík stanovenia genotypu v týchto polymorfizmoch sme genotypizovali 104 zdravých kontrol a 295 pacientov v štúdi GERD, 273 zdravých kontrol a 303 pacientov v štúdi ASTMA a 118 systémovo zdravých kontrol, 205 systémovo zdravých pacientov s CP a 86 subjektov trpiacich T2DM a CP v štúdi T2DM a CP. Navyše boli merané koncentrácie adipocytokínov adiponektínu, leptínu a rezistínu v štúdiách ASTMA i T2DM a CP. V štúdi Astma bol asociovaný polymorfizmus rs1501299 v *ADIPOQ* géne so skúmaným ochorením, v štúdi T2DM a CP sa javí variabilita v rovnakom mieste sekvencie ako možný protektívny marker pre CP. Výsledky štúdie T2DM a CP boli spísané do článku a sú momentálne v recenznom konaní v medzinárodnom impaktovanom časopise *Mediators of Inflammation*.

8 Summary

Given goals of the thesis have been reached. In theoretical section, based on study research focused on adipocytokine gene variability in inflammatory diseases GERD, asthma, T2DM and/or CP, 6 polymorphisms in genes *ADIPOQ*, *LEP*, *LEPR* and *RETN* have been selected for a case-control study in Czech population. Using genotype determining methods optimized for these polymorphisms, we have genotyped 104 healthy controls and 295 patients in the GERD study, 273 healthy controls and 303 patients in study ASTHMA and 118 healthy controls, 205 systemically healthy patients with CP and 86 subjects with T2DM and CP in study T2DM and CP. In addition, concentrations of adipocytokines adiponectin, leptin and resistin have been measured in studies ASTHMA and T2DM and CP. In ASTHMA study, polymorphism rs1501299 in *ADIPOQ* gene has been associated with investigated disease. In T2DM and CP study, variability on the same sequence spot appears as a possible protective marker for CP. Results of T2DM and CP study have been written up in a research article, which now undergoes a review procedure in international impacted journal *Mediators of Inflammation*.

9 Literatura

- Abdelkader, N.A. a kol., 2015. Impact of anthropometric measures and serum leptin on severity of gastroesophageal reflux disease. *Diseases of the Esophagus*, 28(7), s.691–698.
- Adamczak, M a kol., 2013. The Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Seminars in Nephrology*, 33(1), s.2–13.
- Almers, L.M. a kol., 2015. Adiponectin may modify the risk of Barrett's esophagus in patients with gastroesophageal reflux disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(13), s.2256–2264.
- American Diabetes Association, A.D., 2016. Standards of Medical Care in Diabetes-2016 Abridged for Primary Care Providers. *Clinical diabetes: a publication of the American Diabetes Association*, 34(1), s.3–21.
- Armitage, G.C., 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), s.1–6.
- Baek, H. a kol., 2011. Serum leptin and adiponectin levels correlate with exercise-induced bronchoconstriction in children with asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 107(July), s.14–21.
- Baier, L.J. a kol., 2004. Genetic Studies of the Etiology of Type 2 Diabetes in Pima Indians: Hunting for Piecer to a Complicated Puzzle. *Diabetes*, 53(May), s.1181–1186.
- Benomar, Y. a kol., 2006. Insulin and Leptin Induce Glut4 Plasma Membrane Translocation and Glucose Uptake in a Human Neuronal Cell Line by a Phosphatidylinositol 3-Kinase- Dependent Mechanism. *Endocrinology*, 147(5), s.2550–2556.
- Bergman, R.N. a kol., 2000. Free Fatty Acids and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(9), s.351–356.
- Bouldin, M.J. a kol., 2006. The effect of obesity surgery on obesity comorbidity. *The American journal of the medical sciences*, 331(4), s.183–93.
- Bowrey, D.J. a kol., 2000. Gastroesophageal reflux disease in asthma: effects of medical and surgical antireflux therapy on asthma control. *Annals of surgery*, 231(2), s.161–72.
- Carbone, F. a kol., 2012. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie*, 94(10), s.2082–2088.
- Cartegni, L. a kol., 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics*, 3(4), s.285–298.
- Chehab, F.F. a kol., 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics*, 12(3), s.318–320.
- Chi, S. a kol., 2009. Association of -394C>G and -420C>G polymorphisms in the RETN

- gene with T2DM and CHD and a new potential SNP might be exist in exon 3 of RETN gene in Chinese. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 330, s.31–38.
- Cho, Y.M. a kol., 2004. Common genetic polymorphisms in the promoter of resistin gene are major determinants of plasma resistin concentrations in humans. *Diabetologia*, 47, s.559–565.
- Choe, E.Y. a kol., 2013. Variants of the Adiponectin Gene and Diabetic Microvascular Complications in Patients with Type 2 Diabetes. *Metabolism*, 62(5), s.677–685.
- Choi, J. a kol., 2014. Dual matrilineal geographic distribution of Korean type 2 diabetes mellitus-associated -11,377 G adiponectin allele. *Molecular Medicine Reports*, 10, s.2993–3002.
- Commings, S.P. a kol., 1999. Induction of Uncoupling Protein Expression in Brown and White Adipose Tissue by Leptin. *Endocrinology*, 140(1), s.292–300.
- Damrongrungruang, T. a kol., 2015. Correlation between SNP genotypes and periodontitis in Japanese type II diabetic patients: a preliminary study. *Odontology*, 103(2), s.233–240.
- Ding, Y. a kol., 2015. Plasma Adiponectin Concentrations and Adiponectin Gene Polymorphisms Are Associated with Bronchial Asthma in the Chinese Li Population. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 14(June), s.292–297.
- Doecke, J.D. a kol., 2008. Single Nucleotide Polymorphisms in Obesity-Related Genes and the Risk of Esophageal Cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17(April), s.1007–1013.
- Dong, J. a kol., 2018. Determining Risk of Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma Based on Epidemiologic Factors and Genetic Variants. *Gastroenterology*, 154(5), s.1273–1281.
- Van Dyke, T.E. a kol., 2005. Risk Factors for Periodontitis. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 7(1), s.3–7.
- El-Serag, H.B. a kol., 2014. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*, 63(6), s.871–880.
- El-Shal, A.S. a kol., 2013. Association of resistin gene polymorphisms with insulin resistance in Egyptian obese patients. *Gene*, 515(1), s.233–238.
- Emilsson, V. a kol., 1997. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes*, 46(2), s.313–6.
- Engin, A., 2017. Adiponectin-Resistance in Obesity. V *Advances in experimental medicine and biology*. s. 415–441.
- Fain, J.N. a kol., 2003. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochemical and biophysical research communications*, 300(3), s.674–8.
- Fantuzzi, G., 2005. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and*

Clinical Immunology, (May), s.911–919.

- Festa, A. a kol., 2000. Chronic Subclinical Inflammation as Part of the Insulin Resistance Syndrome. *Circulation*, 102(1), s.42–47.
- Filková, M. a kol., 2009. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clinical Immunology*, 133(2), s.157–170.
- Friedman, J.M. a kol., 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), s.763–770.
- Furugen, R. a kol., 2008. The relationship between periodontal condition and serum levels of resistin and adiponectin in elderly Japanese. *Journal of Periodontal Research*, 43, s.556–562.
- Garcia, J.M. a kol., 2014. Circulating Inflammatory Cytokines and Adipokines are Associated With Barrett's Esophagus: a Case – Control Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 12(2), s.229–238.
- Gerber, M. a kol., 2005. Serum Resistin Levels of Obese and Lean Children and Adolescents: Biochemical Analysis and Clinical Relevance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(8), s.4503–4509.
- Gnacińska, M. a kol., 2009. Role of adipokines in complications related to obesity. A review. *Advances in Medical Sciences*, 54(2), s.150–7.
- Goncalves, T.E.D. a kol., 2015. Local and serum levels of adipokines in patients with obesity after periodontal therapy : *Journal of Clinical Periodontology*, 42, s.431–439.
- Gorska, E. a kol., 2010. Leptin receptors. *European journal of medical research*, 15 Suppl 2, s.50–4.
- Greenberg, A.S. a kol., 2006. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, s.461–465.
- Greer, K.B. a kol., 2015. Associations of Serum Adiponectin and Leptin With Barrett's Esophagus. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, s.1–7.
- Grunfeld, C. a kol., 1996. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *The Journal of clinical investigation*, 97(9), s.2152–7.
- Gu, H.F. a kol., 2004. Single Nucleotide Polymorphisms in the Proximal Promoter Region of the Adiponectin (APM1) Gene Are Associated With Type 2 Diabetes in Swedish Caucasians. *Diabetes*, 53, s.31–35.
- Hara, K. a kol., 2002. Genetic Variation in the Gene Encoding Adiponectin Is Associated With an Increased Risk of Type 2 Diabetes in the Japanese Population. *Diabetes*, 51(February), s.536–540.
- Hayashikawa, Y. a kol., 2015. Association of serum adiponectin with asthma and pulmonary function in the Japanese population. *Endocrine Journal*, 62(8), s.695–709.
- Hiroshima, Y. a kol., 2012. Resistin in gingival crevicular fluid and induction of resistin

- release by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human neutrophils. *Journal of Periodontal Research*, 47, s.554–562.
- Houseknecht, K.L. a kol., 1998. The biology of leptin: a review. *Journal of animal science*, 76(5), s.1405–20.
- Inadera, H., 2008. The usefulness of circulating adipokine levels for the assessment of obesity-related health problems. *International Journal of Medical Sciences*, 5(5), s.248–262.
- Izakovicova Holla, L. a kol., 2004. Analysis of the Interleukin-6 Gene Promoter Polymorphisms in Czech Patients with Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 75(1), s.30–36.
- Izakovicova Holla, L. a kol., 2013. Haplotypes of the IL-1 gene cluster are associated with gastroesophageal reflux disease and Barrett's esophagus. *Human Immunology*, 74(9), s.1161–1169.
- Jamaluddin, M.S. a kol., 2012. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *British Journal of Pharmacology*, 165(3), s.622–632.
- Jánoš, J., 2016. *Genová variabilita v adipocytokinech u diabetes mellitus a chronické parodontitidy*. Masarykova univerzita.
- Jiang, C.Y. a kol., 2013. The adipocytokine resistin stimulates the production of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in pancreatic acinar cells via NF- κ B activation. *Journal of endocrinological investigation*, 36(11), s.986–92.
- Kadowaki, T. a kol., 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Reviews*, 26(3), s.439–451.
- Kamohara, S. a kol., 1997. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, 389(6649), s.374–377.
- Kardeşler, L. a kol., 2010. Adipokines and Inflammatory Mediators After Initial Periodontal Treatment in Patients With Type 2 Diabetes and Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 81(1), s.24–33.
- Kendall, B.J. a kol., 2007. Leptin and the risk of Barrett's oesophagus. *Gut*, 57(4), s.448–454.
- Khorsand, A. a kol., 2016. Evaluation of Salivary Leptin Levels in Healthy Subjects and Patients with Advanced Periodontitis. *Journal of Dentistry (Tehran)*, 13(1), s.1–9.
- Krejsek, J. a kol., I., 2016. *Imunologie člověka* 1. vydanie., Hradec Králové: Garamon.
- Krysiak, R. a kol., 2012. The role of adipokines in connective tissue diseases. *European Journal of Nutrition*, 51(5), s.513–528.
- Lessard, A. a kol., 2011. Leptin and adiponectin in obese and non-obese subjects with asthma. *Biomarkers*, 16(December 2010), s.271–273.
- Li, Z.-P. a kol., 2015. Relation between ADIPOQ Gene Polymorphisms and Type 2

Diabetes. *Genes*, 6(3), s.512–519.

López-Jaramillo, P. a kol., 2014. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 18(1), s.37–45.

Lord, G.M. a kol., 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394(6696), s.897–901.

Lu, H. a kol., 2009. Polymorphism of human leptin receptor gene is associated with type 2 diabetic patients complicated with non-alcoholic fatty liver disease in China. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(January 2004), s.228–232.

Makino, H. a kol., 2009. A Pilot Study Suggests that the G/G Genotype of Resistin Single Nucleotide Polymorphism at -420 May Be an Independent Predictor of a Reduction in Fasting Plasma Glucose and Insulin Resistance by Pioglitazone in Type 2 Diabetes. *Endocrine Journal*, 56(9), s.1049–1058.

Mealey, B.L. a kol., 2006. Diabetes Mellitus and Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology*, 77(August), s.1289–1303.

Mealey, B.L. a kol., 2007. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontology 2000*, 44, s.127–153.

Medici, F. a kol., 1999. Concordance rate for Type II diabetes mellitus in monozygotic twins: actuarial analysis. *Diabetologia*, 42, s.146–150.

Mendoza-Azpur, G. a kol., 2015. Adiponectin, leptin and TNF- α serum levels in obese and normal weight Peruvian adults with and without chronic periodontitis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 7(3), s.380–386.

Menzaghi, C. a kol., 2004. Multigenic control of serum adiponectin levels: evidence for a role of the APM1 gene and a locus on 14q13. *Physiological Genomics*, 19(2), s.170–174.

Morales, A. a kol., 2004. Adiponectin and Leptin Concentrations May Aid in Discriminating Disease Forms in Children and Adolescents With Type 1 and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 27(8).

Nečas, E., 2003. *Patologická fyziologie orgánových systémů*. 1. vydanie., Praha: Univerzita Karlova v Praze.

Nokhbehsaim, M. a kol., 2014. Beneficial Effects of Adiponectin on Periodontal Ligament Cells under Normal and Regenerative Conditions. *Journal of Diabetes Research*, 2014, s.1–11.

Nokhbehsaim, M. a kol., 2014. Leptin Effects on the Regenerative Capacity of Human Periodontal Cells. *International Journal of Endocrinology*, 2014.

Ogawa, H. a kol., 2014. Effect of periodontal treatment on adipokines in type 2 diabetes. *World Journal of Diabetes*, 5(6), s.924.

Osawa, H. a kol., 2004. The G/G Genotype of a Resistin Single-Nucleotide Polymorphism at -420 Increases Type 2 Diabetes Mellitus Susceptibility by Inducing Promoter

Activity through Specific Binding of Sp1/3. *American Society of Human Genetics*, 75, s.678–686.

Ozde, C. a kol., 2015. The relationship between adiponectin levels and epicardial adipose tissue thickness in non-obese children with asthma. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 33, s.289–296.

Pandolfino, J.E. a kol., 2006. Obesity: A Challenge to Esophagogastric Junction Integrity. *Gastroenterology*, 130(3), s.639–649.

Patel, L. a kol., 2003. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochemical and biophysical research communications*, 300(2), s.472–6.

Patel, S.P. a kol., 2013. Resistin in serum and gingival crevicular fluid as a marker of periodontal inflammation and its correlation with single-nucleotide polymorphism in human resistin gene at –420. *Contemporary Clinical Dentistry*, 4(2), s.192–197.

Pérez-Pérez, A. a kol., 2017. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 35, s.71–84.

Phillips, S.A. a kol., 2010. Mechanisms of adiponectin regulation and use as a pharmacological target. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(6), s.676–683.

Pihlstrom, B.L. a kol., 2005. Periodontal diseases. *The Lancet*, 366(November), s.1809–1820.

Povýšil, C. a kol., 2011. *Obecná Patologie*, Galén.

Qi, L. a kol., 2006. Adiponectin Genetic Variability, Plasma Adiponectin, and Cardiovascular Risk in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 55(May), s.1512–1516.

Qi, L. a kol., 2006. Dietary Fibers and Glycemic Load, Obesity, and Plasma Adiponectin Levels in Women With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 29(7), s.1501–1505.

Rava, M. a kol., 2015. Gene–environment interactions in the study of asthma in the postgenomewide association studies era. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 15(1), s.70–78.

Rho, Y.H. a kol., 2009. Adipocytokines Are Associated with Radiographic Joint Damage in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 60(7), s.1906–1914.

Rubenstein, J.H. a kol., 2008. A Pilot Study of the Association of Low Plasma Adiponectin and Barrett's Esophagus. *American Journal of Gastroenterology*, s.1358–1364.

Rubenstein, J.H. a kol., 2009. Association of adiponectin multimers with Barrett's oesophagus. *Gut*, 58(12), s.1583–1589.

Saito, T. a kol., 2007. Elevation of serum adiponectin and CD146 levels in diabetic nephropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 78, s.85–92.

Saito, T. a kol., 2008. Serum Levels of Resistin and Adiponectin in Women with

- Periodontitis: the Hisayama Study. *Journal of Dental Research*, 87(4), s.319–322.
- Sanna, V. a kol., 2003. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *Journal of Clinical Investigation*, 111(2), s.241–250.
- Schwartz, M.W. a kol., 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), s.661–671.
- Sete, M.R.C. a kol., 2015. Serum Adipokine Levels and their Relationship with Fatty Acids in Patients with Chronic Periodontitis. *Brazilian Dental Journal*, 26(2), s.169–174.
- Shi, D. a kol., 2015. Association between Plasma Leptin Level and Systemic Inflammatory Markers in Patients with Aggressive Periodontitis. *Chinese Medical Journal*, 128(4), s.528–532.
- Sood, A. a kol., 2012. Low Serum Adiponectin Predicts Future Risk for Asthma in Women. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(1), s.41–47.
- Steppan, C.M. a kol., 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409, s.307–312.
- Stofkova, A. a kol., 2009. Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocrine regulations*, 43(4), s.157–68.
- Su, S. a kol., 2016. The association between leptin receptor gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus : A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 121, s.49–58.
- Suriyaprom, K. a kol., 2009. The +299 (G>A) Resistin Gene Polymorphism and Susceptibility to Type 2 Diabetes in Thais. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 44(January), s.104–110.
- Swellam, M. a kol., 2009. Clinical implications of adiponectin and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes mellitus. *Disease Markers*, 27, s.269–278.
- Szczepankiewicz, A. a kol., 2009. Are Genes Associated with Energy Metabolism Important in Asthma and BMI? *Journal of Asthma*, 46(15), s.53–58.
- Takahashi, M. a kol., 2000. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24(7), s.861–8.
- Tartaglia, L.A., 1997. The leptin receptor. *The Journal of biological chemistry*, 272(10), s.6093–6.
- Thomas, S.J. a kol., 2015. Ghrelin and Leptin Have a Complex Relationship with Risk of Barrett's Esophagus. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(1), s.70–79.
- Tilg, H. a kol., 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews*, 6(October), s.772–784.
- Tsaroucha, A. a kol., 2013. Leptin, Adiponectin, and Ghrelin Levels in Female Patients

- with Asthma during Stable and Exacerbation Periods. *Journal of Asthma*, 50(2), s.188–197.
- Tseng, P. a kol., 2015. Associations of Circulating Gut Hormone and Adipocytokine Levels with the Spectrum of Gastroesophageal Reflux Disease. *PLoS ONE*, s.1–12.
- Tsukahara, T. a kol., 2009. Polymorphism in resistin promoter region at -420 determines the serum resistin levels and may be a risk marker of stroke in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 84, s.179–186.
- Wang, S. a kol., 2017. Glycemic control and adipokines after periodontal therapy in patients with Type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Brazilian oral research*, 31, s.e90.
- Wen, Y. a kol., 2013. Association between resistin gene -420 C/G polymorphism and the risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Acta Diabetologica*, 50, s.267–272.
- Weyer, C. a kol., 2001. Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes: Close Association with Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(5), s.1930–1935.
- Winning, L. a kol., 2017. Periodontitis and Systemic Disease: Association or Causality? *Current oral health reports*, 4(1), s.1–7.
- World Health Organisation, 2018. Obesity - Situation and trends. Available at: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/ [Cit február 16, 2018].
- Yang, M.M. a kol., 2016. Variations in the Obesity Gene “LEPR” Contribute to Risk of Type 2 Diabetes Mellitus: Evidence from a Meta-Analysis. *Journal of Diabetes Research*, 2016.
- Yang, W.-S. a kol., 2003. Allele-specific differential expression of a common adiponectin gene polymorphism related to obesity. *Journal of Molecular Medicine*, 81(7), s.428–434.
- Yoshino, T. a kol., 2011. Elevated Serum Levels of Resistin, Leptin, and Adiponectin are Associated with C-reactive Protein and also Other Clinical Conditions in Rheumatoid Arthritis. *Internal Medicine*, 50, s.269–275.
- Zhang, F. a kol., 1997. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*, 387(6629), s.206–209.
- Zhang, Z. a kol., 2014. Resistin Stimulates Expression of Chemokine Genes in Chondrocytes via Combinatorial Regulation of C/EBP β and NF- κ B. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), s.17242–17255.
- Zhao, Y. a kol., 2003. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*, 300(2), s.247–52.
- Zhu, J. a kol., 2017. Association of circulating leptin and adiponectin with periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC oral health*, 17(1), s.104.

Zimmermann, G.S. a kol., 2013. Local and Circulating Levels of Adipocytokines in Obese and Normal Weight Individuals With Chronic Periodontitis. *J Periodontol*, 84(5), s.624–633.