

Genová variabilita v imunoregulačních faktorech u pacientů s chronickou parodontitidou a diabetes mellitus

(Původní práce – experimentální studie)

Gene Variability in Immunoregulatory Factors in Patients with Chronic Periodontitis and Diabetes Mellitus

(Original Article – Experimental Study)

Bořilová Linhartová P.^{1,2}, Valová S.², Kaštovský J.^{1,2}, Poskerová H.¹, Vokurka J.¹, Fassmann A.¹, Izakovičová Hollá L.^{1,2}

¹Stomatologická klinika LF MU a FN u sv. Anny, Brno

²Ústav patologické fyziologie LF MU, Brno

SOUHRN

Úvod a cíl studie: Genetické predispozice hrají významnou roli v etiopatogenezi jak chronické parodontitidy (CP), tak i diabetes mellitus (DM), mezi kterými existuje reciproční vztah. U obou chorob jsou za kandidátní považovány geny pro imunoregulační faktory, k nimž se řadí signální peptidy zvané cytokiny. Cílem naší studie bylo analyzovat polymorfismy ve vybraných cytokinech, konkrétně v *interleukin-1 (IL-1)* genovém klasteru a v *IL-6* genu, u pacientů s CP s/bez DM a porovnat je se zdravou populací.

Metodika: Do studie případů a kontrol (tzv. case-control study) jsme zařadili celkem 590 osob: 226 zdravých; 248 pacientů pouze s CP, 36 pacientů s CP i DM 1. typu (T1DM), 80 pacientů s CP a DM 2. typu (T2DM). Pro genotypizaci jsme využili postupů založených na polymerázové řetězové reakci (PCR) a následné restriční analýze.

Výsledky: Frekvence alel a genotypů sledovaných polymorfismů ve vybraných cytokinech, kromě varianty v *IL-1B* genu se mezi skupinami pacientů a zdravými jedinci statisticky významně nelišily. V *IL-1* genovém klasteru jsme však našli protektivní haplotyp u CP a haplotypy zvyšující riziko rozvoje CP u pacientů s T2DM i s T1DM. Rovněž v genu pro *IL-6* jsme prokázali signifikantní rozdíl ve frekvenci haplotypu GGG mezi pacienty s CP a zdravými jedinci.

Závěr: Naše výsledky naznačují, že na rozdíl od analýz jednotlivých polymorfismů různé haplotypy v *IL-1* genovém klasteru i v promotoru genu pro *IL-6* mohou ovlivňovat riziko rozvoje CP u pacientů s/bez DM v české populaci. Domníváme se, že stanovení haplotypů má, oproti sledování jednotlivých alelických a genotypových frekvencí, lepší výpovědní hodnotu a měla by mu být dána při genetické analýze komplexních nemocí přednost.

Klíčová slova: parodontitida – diabetes mellitus – genová variabilita – cytokiny – interleukiny

SUMMARY

Introduction and aim of study: Genetic predispositions play an important role in the etiopathogenesis of periodontal diseases (CP) and diabetes mellitus (DM). Recent studies have also proven a bidirectional interrelationship between these conditions. The immunoregulatory factors, including signal peptides, so called cytokines, are considered as candidate genes for both of these diseases. The aim of our study was to analyse polymorphisms in selected cytokines, namely in the *interleukin-1 (IL-1)* gene cluster and *IL-6* gene, in patients with CP and with/without DM and compare them with the healthy population.

Methods: 590 subjects were enrolled in this case-control study: 226 healthy/non-periodontitis subjects, 248 patients only with CP, 36 patients with CP and type 1 DM (T1DM), 80 patients with CP and

type 2 DM (T2DM). For genotyping methods based on polymerase chain reaction (PCR) and subsequent restriction analysis were used.

Results: The allele and genotype frequencies of the studied polymorphisms, except for a variant in the *IL-1B* gene, did not differ significantly between the groups of patients and healthy controls. However, in the *IL-1* gene cluster, a protective haplotype in CP and risk haplotypes for CP in patients with T2DM or with T1DM were found. In addition, in the *IL-6* gene, a significant difference in GGG haplotype frequencies between the groups of patients with CP and healthy controls was identified.

Conclusion: Our results suggest, that contrary to analyses of individual polymorphisms, different haplotypes in the *IL-1* gene cluster and *IL-6* gene promoter may affect the risk for CP development in patients with/without DM in Czech population. We assume that the determination of haplotypes may have a better predictive value than study of individual allele and genotype frequencies and it should be preferred in genetic analysis of complex diseases.

KEYWORDS: *periodontitis - diabetes mellitus - gene variability - cytokines - interleukins*

Čes. Stomat., roč. 115, 2015, č.4, s. 89-97

ÚVOD A CÍLE STUDIE

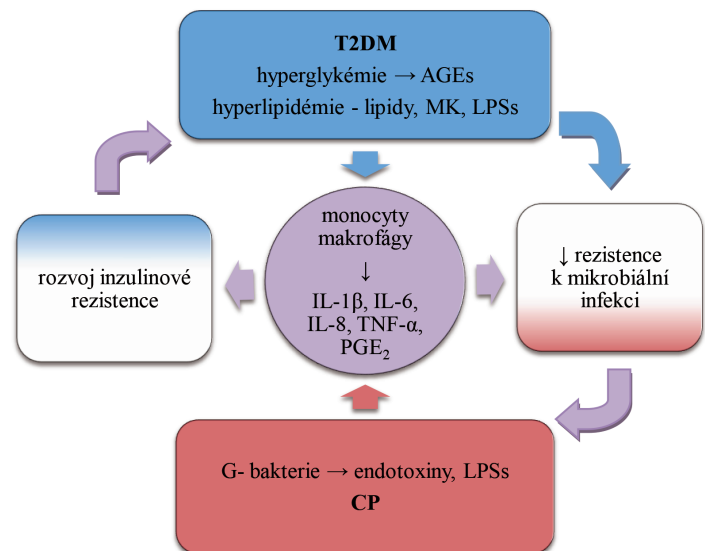
Význam vybraných cytokinů u parodontitidy a diabetes mellitus

Parodontitida je onemocnění vyvolané bakteriemi (zejména gramnegativními), při kterém dochází k rozvoji chronického zánětu, což má za následek ztrátu pojivové tkáně, alveolární kosti a nakonec i zubů. Rovněž průběh diabetes mellitus (DM), který zahrnuje skupinu metabolických onemocnění charakterizovaných hyperglykemií, je chronický a na jeho vzniku i progresi se podílí zánětlivá reakce. Mezi oběma chorobami existuje reciproční vztah, který je v poslední době intenzivně studován [4]. Kromě environmentálních faktorů (stres, kouření, obezita atd.) hraje v etiopatogenezi těchto komplexních chorob roli také genetická predispozice. Za kandidátní jsou mimo jiné považovány geny pro imunoregulační faktory, k nimž se řadí signální peptidy zvané cytokiny. Význam cytokinů, především pak interleukinu-1 (IL-1) a interleukinu-6 (IL-6), v obousměrném vztahu chronické parodontitidy (CP) a DM 2. typu (T2DM) je znázorněn na obr. 1 [28, 33].

Interleukin-1

IL-1 je pluripotentní cytokin, který patří k hlavním mediátorům zánětlivého procesu. Prozánětlivou aktivitu vykazují jeho dvě formy IL-1 α a IL-1 β v kontrastu s protizánětlivými schopnostmi antagonisty IL-1 receptoru (IL-1RA) [8].

U pacientů s parodontitidou byly v gingivě nalezeny zvýšené hladiny IL-1 α a IL-1 β [18] a významně vyšší hladiny IL-1 β v gingivální tekutině vykazovali také pacienti s DM 1. typu (T1DM) [32] a pacienti s T2DM s CP ve srovnání s nediabetickými kontrolami [3, 6]. Hypotézu o vlivu hyperglykémie na stupeň



Obr. 1 Význam cytokinů v obousměrném vztahu chronické parodontitidy (CP) a diabetes mellitus 2. typu (T2DM), upraveno podle [26, 31].

Hyperglykémie charakteristická pro onemocnění T2DM je příčinným faktorem vzniku pozdních produktů glykace (AGEs), což společně s vyšší koncentrací lipidů, mastných kyselin (MK) a s lipopolysacharidy (LPSs) ovlivňuje nejen funkci buněk imunitního systému a produkci prozánětlivých molekul, ale také narušuje metabolismus tkání parodontu. V důsledku těchto dějů dochází ke snížení odolnosti vůči mikrobiální infekci vedoucí ke vzniku a rozvoji CP, kde gramnegativní (G-) bakterie uvolňují endotoxiny a LPSs a indukují odpověď monocytů a makrofágů ve formě aktivace mediátorů zánětu. Mezi ně patří tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), prostaglandin E2 (PGE2) a dále celá řada cytokinů, především pak interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 a IL-8, které se mohou podílet na rozvoji inzulinové rezistence a na destrukci β -buněk pankreatu. Mezi T2DM a CP vzniká tzv. bludný kruh (circulus vitiosus); funkce cytokinů a variabilita v jejich genech tak mohou hrát významnou roli v pochopení těchto komplikovaných vztahů.

zánětlivé odpovědi u parodontitidy potvrdila studie na potkaním modelu, jejíž výsledky naznačují, že DM může zvyšovat produkci IL-1 β , tumor nekroti-

Genová variabilita v imunoregulačních faktorech u pacientů s chronickou parodontitidou a diabetes mellitus

zujícího faktoru-alfa (TNF- α) a lipopolysacharidů (LPSs) v parodontálních tkáních [17]. V nedávno publikované studii bylo zjištěno, že IL-1 β a TNF- α mohou ovlivňovat inzulinovou rezistenci a poškození β -buněk pankreatu [27]. Protektivní role je pak přisuzována IL-1RA, jehož vyšší exprese ve slinách byla pozorována u pacientů s T2DM a zdravým parodontem [12].

Proteiny IL-1 α , IL-1 β a IL-1RA jsou kódovány geny *IL-1A*, *IL-1B* a *IL-1RN*, které jsou součástí *IL-1* genového klastru o velikosti 430 kb lokalizovaného na chromozomu 2q14-q21 [37]. Polymorfismy v těchto genech mohou přispět ke změnám v produkci příslušných cytokinů a jsou intenzivně zkoumány u různých zánětlivých chorob. Existují také studie u pacientů s T2DM zabývající se vztahem mezi parodontitidou a variabilitou v *IL-1* genovém klastru [11, 22, 38].

Interleukin-6

Patogeneze obou onemocnění je spojená i s vysokými hladinami IL-6 [10, 29, 39], pleiotropního cytokinu zapojujícího se do regulace imunitního systému a zánětlivých procesů, hematopoezy a metabolismu kostí. IL-6 také ovlivňuje inzulinovou rezistenci v játrech i tukové tkáni a společně s dalšími prozánětlivými cytokiny se může podílet na poškození β -buněk Langerhansových ostrůvků [21].

Jelikož míra exprese *IL-6* genu může být ovlivněna polymorfismy v jeho promotorové oblasti [41], probíhají intenzivní studie zkoumající jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) -174G/C (rs1800795), -572G/C (rs1800796) a -597G/A (rs1800797) u pacientů s CP s/bez DM ve srovnání se zdravými kontrolami [35, 36, 42]. Nicméně dosavadní analýzy v rozličných populacích, které zkoumaly především rozdíly v alelických a genotypových frekvencích jednotlivých polymorfismů, jsou obdobně jako u studií zabývajících se variabilitou v *IL-1* genu rozporuplné.

Cíl práce

Cílem naší studie bylo analyzovat nejenom alelové a genotypové distribuce polymorfismů ve vybraných cytokinech, konkrétně IL-1 α a β , antagonisty jeho receptoru a IL-6, ale zaměřili jsme se též na možnou asociaci jejich alelických kombinací (tzv. haplotypů) s CP s/bez DM.

MATERIÁL A METODY

Popis souboru a klinické vyšetření

Do studie případů a kontrol (tzv. case-control study) jsme vybrali 590 nepříbuzných osob z regionu jižní Moravy, které jsme vyšetřili v letech 2005 až 2015 na Parodontologickém oddělení Stomatologické kliniky Fakultní nemocnice u svaté Anny v Brně (H.P., J.V., A.F.). Kritéria pro zařazení do studie byla následující: věk vyšší než 30 let, přítomnost více než 16 vlastních zubů (kromě třetích molárů), pacienti nesměli podstoupit parodontologickou léčbu během uplynulých šesti měsíců anebo užívat v posledních třech měsících antibiotika. Ze studie jsme vyloučili těhotné a kojící ženy, pacienty po transplantacích orgánů, osoby se závažnými systémovými chorobami (hematologická, onkologická a autoimunitní onemocnění, infekce HIV) a pacienty dlouhodobě užívající kortikosteroidy, imunosupresiva a nesteroidní antiflogistika. Základní charakteristika pacientů i kontrolních osob je uvedena v tabulce 1.

U pacientů s CP i osob bez parodontitidy jsme odebrali celkovou a stomatologickou anamnézu, detailně klinicky vyšetřili stav chrupu a parodontu a provedli rentgenologické vyšetření. Pomocí parodontální sondy UNC-15 jsme provedli na každém zubu měření a zaznamenali hloubku parodontálních chobotů (probing pocket depth, PD) ve čtyřech lokalitách (distálně, vestibulárně, meziálně, orálně). Ve stejných lokalitách jsme měřili velikost gingiválních recesů (GR) a zapsali jsme i lokality s výraznou hyperplazií gingivy. Z těch-

Tab. 1 Demografická a klinická data pacientů s CP, CP+T1DM, CP+T2DM a kontrolních osob

Charakteristika	Kontroly N = 226	CP N = 248	CP+T1DM N = 36	CP+T2DM N = 80
Věk (průměrný věk \pm SD)	52,8 \pm 11,0	54,4 \pm 8,0	49,8 \pm 9,6	65,6 \pm 9,6
Pohlaví (muži/ženy)	115/111	117/131	16/20	40/40
Kouření (ne/ano, %)	72,6/27,4	71,3/29,7	77,8/22,2	87,7/12,3
Doba trvání diabetu (roky \pm SD)	-	-	24,7 \pm 11,6	11,2 \pm 8,7
PD (průměr v mm \pm SD)	1,21 \pm 0,30	3,23 \pm 0,76	3,54 \pm 0,93	3,80 \pm 1,03
GR (průměr v mm \pm SD)	0,16 \pm 0,28	0,72 \pm 0,53	0,87 \pm 0,77	1,09 \pm 0,78
CAL (průměr v mm \pm SD)	1,38 \pm 0,25	3,96 \pm 1,01	4,41 \pm 1,48	4,88 \pm 1,31

CAL = klinická ztráta úponu, CP = chronická parodontitida, GR = gingivální recesy, N = počet jedinců, PD = hloubka parodontálních chobotů,

SD = směrodatná odchylka, T1DM = diabetes mellitus 1. typu, T2DM = diabetes mellitus 2. typu

to údajů jsme následně vypočetli klinickou ztrátu úponu (clinical attachment loss, CAL).

Zkoumaný soubor zahrnoval:

i) 226 zdravých osob, které netrpěly CP, DM ani jinými systémovými chorobami podle výše uvedených kritérií. Osoby zařazené do kontrolní skupiny měly hodnotu CAL menší než 2 mm.

ii) 364 pacientů s generalizovanou CP, kteří splňovali diagnostická kritéria definovaná podle American Academy of Periodontology (AAP) [2]. Mezi kritéria pro zařazení pacientů do této skupiny patřilo: minimálně 30 % postižených zubů a CAL \geq 2 mm. Tyto pacienty jsme dále rozdělili do tří podskupin v závislosti na přítomnosti onemocnění a typu DM:

1. 248 pacientů bez DM a jiných systémových onemocnění,
2. 36 pacientů s T1DM,
3. 80 pacientů s T2DM.

U pacientů s DM jsme zaznamenali hladiny glykémie, glykovaného hemoglobinu (HbA1c) a lipidů (celkový cholesterol, HDL, LDL a triacylglyceroly), viz tab. 2, dále farmakoterapii a informace o komplikacích spojených s DM podle zdravotní dokumentace z diabetologických ordinací. Do studie jsme zařadili jen ty osoby s DM, u kterých onemocnění trvalo déle než tři roky.

Studie byla schválena Etickou komisí Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice u svaté Anny v Brně. Písemný informovaný souhlas podepsaly všechny osoby před zařazením do studie v souladu s Helsinskou deklarácí.

Izolace DNA a genotypizace

Izolaci DNA a stanovení genotypů pro SNPs v *IL-1* genovém klasteru: *IL-1A* -889C/T (rs1800587), *IL-1B* +3953C/T (rs1143634) a variabilního počtu tandemových repetitiv (VNTR polymorfismus) ve 2. intronu

Tab. 2 Koncentrace glukózy v krvi (glykémie), glykovaného hemoglobinu a lipidů u pacientů s CP+T1DM a CP+T2DM

Charakteristika	CP+T1DM	CP+T2DM	p
glykémie (mmol/l \pm SD)	7,34 \pm 2,34	7,57 \pm 2,13	0,61
HbA1c (mmol/mol \pm SD)	69,36 \pm 11,56	58,26 \pm 15,66	0,001*
celkový cholesterol (mmol/l \pm SD)	4,78 \pm 0,72	4,77 \pm 1,01	0,94
HDL (mmol/l \pm SD)	1,65 \pm 0,39	1,33 \pm 0,63	0,01*
LDL (mmol/l \pm SD)	2,70 \pm 0,64	2,81 \pm 0,92	0,56
TAG (mmol/l \pm SD)	1,01 \pm 0,64	1,96 \pm 1,14	0,001*

CP = chronická parodontitida, HbA1c = glykovaný hemoglobin, p = p-hodnota, SD = směrodatná odchylka, TAG = triacylglyceroly, T1DM = diabetes mellitus 1. typu, T2DM = diabetes mellitus 2. typu, *p < 0,05

genu pro *IL-1RN* jsme provedli podle již dříve publikovaných protokolů [16] (P.B.L., J.K.).

Analýza polymorfismů v promotoru *IL-6* genu -174G/C (rs1800795), -572G/C (rs1800796) a -597G/A (rs1800797) byla založena na principu polymerázové řetězové reakce (PCR) s následnou restrikcí vybranými enzymy; postupovali jsme podle našich již dříve zveřejněných protokolů [15] (S.V.).

Všechny genetické analýzy byly provedeny bez znalosti osobních a klinických údajů vyšetřovaných osob. U 10 % vzorků DNA jsme stanovení genotypů opakovali pro ověření správnosti analýzy.

Statistické hodnocení

Pro hodnocení jsme použili standardní metody deskriptivní statistiky; počítali jsme absolutní a relativní frekvence pro kategoriální proměnné a průměr se směrodatnou odchylkou pro kvantitativní proměnné. Vzhledem k normálnímu rozložení naměřených hodnot jsme stav parodontu i laboratorní nálezy hodnotili pomocí analýzy variance (ANOVA). Významnost rozdílů v alelických frekvencích mezi jednotlivými skupinami jsme počítali Fisherovým exaktním testem. Signifikance odchylek od Hardy-Weinbergova ekvilibria pro každý polymorfismus a rozdíly ve frekvencích genotypů jsme testovali pomocí χ^2 -testu. Haplotypovou analýzu jsme provedli s využitím programu SNP analyzer v. 2.0. (<http://snp.istech21.com/snpanalyzer/2.0/>); hodnotu p < 0,05 jsme považovali za statisticky významnou (L.I.H.).

VÝSLEDKY

Klinické vyšetření

Postižení parodontu u pacientů s CP s/bez diabetu a u zdravých osob jsme hodnotili pomocí PD, GR a CAL, viz tab. 1. U všech skupin pacientů byly hodnoty PD, GR a CAL významně vyšší při porovnání se zdravými kontrolami (p < 0,01). Statisticky významný rozdíl jsme pozorovali i při srovnání pacientů s CP a CP+T2DM (p < 0,01). U nemocných s CP a diabetem obou typů jsme hodnotili také koncentraci glukózy v krvi, HbA1c a lipidů (celkového cholesterolu, HDL, LDL a triacylglycerolů) (tab. 2). Ačkoli se glykémie nelačno nelišila mezi skupinou pacientů s CP+T1DM a CP+T2DM, hladina HbA1c byla významně vyšší u pacientů s T1DM. Tito pacienti měli také vyšší koncentraci HDL cholesterolu (p = 0,01) a nižší průměrnou koncentraci triacylglycerolů (p < 0,01) při porovnání se skupinou pacientů s CP+T2DM.

Interleukin-1

Neprokázali jsme statisticky významnou asociaci alelických ani genotypových frekvencí *IL-*

Genová variabilita v imunoregulačních faktorech u pacientů s chronickou parodontitidou a diabetes mellitus

Tab. 3 Genotypové a alelové frekvence polymorfismu v *IL-1B +3953C/T* (rs1143634) u pacientů s CP, CP+T1DM, CP+ T2DM a u kontrol

Genotypy Alely	Kontroly	CP	OR (95% CI)	CP+T1DM	OR (95% CI)	CP+T2DM	OR (95% CI)
<i>IL-1B +3953 C/T</i>	N (%)	N (%)		N (%)		N (%)	
CC	115 (50,9)	156 (62,9)	1,00	18 (50,0)	1,00	48 (60,0)	1,00
CT	95 (42,0)	80 (32,3)	0,62 (0,42-0,91)	16 (44,4)	1,08 (0,52-2,22)	26 (32,5)	0,66 (0,38-1,14)
TT	16 (7,1)	12 (4,8)	0,55 (0,25-1,21)	2 (5,6)	0,80 (0,17-3,77)	6 (7,5)	0,90 (0,33-2,43)
C	325 (71,9)	392 (79,0)	1,00	52 (72,2)	1,00	122 (76,3)	1,00
T	127 (28,1)	104 (21,0)*	0,68 (0,50-0,91)	20 (27,8)	0,98 (0,57-1,71)	38 (23,8)	0,80 (0,52-1,21)

CI = interval spolehlivosti, CP = chronická parodontitida, *IL-1* = interleukin-1, OR = poměr šancí, T1DM = diabetes mellitus 1. typu, T2DM = diabetes mellitus 2. typu *p < 0,05

1A -889C/T (rs1800587) SNP a VNTR ve 2. intronu *IL-1RN*, ale našli jsme rozdíly ve frekvencích alel *IL-1B +3953C/T* mezi zdravými kontrolami a pacienty s CP (p < 0,02) (tab. 3). Také frekvence tzv. „double genotypu“ složeného z *IL-1A -889C/T* a *IL-1B +3953C/T* SNPs, který byl dříve označován jako „s parodontitidou asociovaný genotyp“, nebyla mezi jednotlivými skupinami statisticky významně rozdílná.

Pro haplotypovou analýzu, při které jsou sledovány frekvence kombinací jednotlivých typů alel zkoumaných polymorfismů, jsme alely s více než dvěma repeticemi označili jako *IL-1RN*L* (dlouhá alela) a alelu se dvěma repeticemi jako *IL-1RN*S* (krátká alela) [16]. Výsledky haplotypové analýzy ukazují, že s rizikem CP je podle aditivního modelu vysoce signifikantně asociován haplotyp TTL (p < 0,01, OR = 0,64, 95% CI = 0,465-0,890). CCL haplotyp jsme shledali rizikový (p < 0,05, OR = 1,94, 95% CI = 1,068-3,506) u pacientů s CP a T2DM v recesivním modelu, stejně tak jako CTL haplotyp (p < 0,05, OR = 3,03, 95% CI = 1,081-8,483) u pacientů s CP a T1DM ve

srovnání se zdravými osobami podle dominantního modelu (tab. 4).

Interleukin-6

Ani v případě sledovaných SNPs v promotoru *IL-6* genu jsme nenašli statisticky významný rozdíl ve frekvencích alel a genotypů mezi pacienty s CP a zdravými jedinci. Analýzou haplotypů jsme prokázali signifikantní rozdíl ve frekvenci haplotypu GGG mezi skupinou pacientů s CP a kontrolami (p < 0,03, OR = 1,679, 95% CI = 1,050-2,685) podle recesivního modelu. Nepozorovali jsme ale statisticky významné rozdíly ve frekvencích haplotypů u pacientů s CP v kombinaci s T1DM nebo T2DM v porovnání se zdravými jedinci (tab. 5).

DISKUSE

Klinické vyšetření

Souvislosti mezi diabetem a onemocněním parodontu jsou známé již řadu let. Většina autorů se shoduje v tom, že diabetes zvyšuje prevalenci,

Tab. 4 Frekvence *IL-1* haplotypů u pacientů s CP, CP+T1DM, CP+T2DM a u kontrol

<i>IL-1A -889C/T</i>	<i>IL-1B +3953C/T</i>	<i>IL-1RN</i> (VNTR) <i>S</i>	Kontroly	CP	CP+T1DM	CP+T2DM
C	C	L	0,4319	0,4857	0,4749	0,5159*
C	C	S	0,2153	0,2185	0,1861	0,1878
T	T	L	0,2146	0,1342*	0,1661	0,1676
T	C	L	0,0497	0,0590	0,0339	0,0322
C	T	L	0,0318	0,0348	0,0890*	0,0156
T	C	S	0,0222	0,0271	0,0273	0,0266
T	T	S	0,0211	0,0378	0,0227	0,0361
C	T	S	0,0136	0,0029	-	0,0182

CP = chronická parodontitida, *IL-1* = interleukin-1, T1DM = diabetes mellitus 1. typu, T2DM = diabetes mellitus 2. typu

SPro haplotypovou analýzu byly alely s více než dvěma repeticemi sloučeny do skupiny s názvem *IL-1RN*L* („long“ alela), alela s dvěma repeticemi byla označena jako *IL-1RN*S* („short“ alela).

Haplotypy jsou seřazeny sestupně dle frekvence haplotypů u kontrol.

*p < 0,05 vs. kontroly

Tab. 5 Frekvence *IL-6* haplotypů u pacientů s CP, CP+T1DM, CP+T2DM a u kontrol

			Kontroly	CP	CP+T1DM	CP+T2DM
<i>IL-6 -174G/C</i>	<i>IL-6 -572G/C</i>	<i>IL-6 -597G/A</i>				
G	G	G	0,4596	0,5228*	0,5000	0,5088
C	G	A	0,4145	0,4214	0,3649	0,4222
G	C	G	0,0645	0,0423	0,1216	0,0498
G	G	A	0,0340	0	0	0
C	G	G	0,0230	0,0135	0,0135	0,0193
C	C	A	0,0046	0	0	0

CP = chronická parodontitida, *IL-6* = *interleukin-6*, T1DM = diabetes mellitus 1. typu, T2DM = diabetes mellitus 2. typu

Haplotypy jsou seřazeny sestupně podle frekvence haplotypů u kontrol.

* $p < 0,05$ vs. kontroly

Pozn. Při analýze polymorfismů v *IL-6* genu jsme sledovali alelické, genotypové a haplotypové frekvence pouze u 181 zdravých osob, 223 pacientů s CP, 36 pacientů s CP a T1DM a 78 pacientů s CP a T2DM.

incidenci, progresi a závažnost parodontitidy [13, 40]. Podle předpokladů byly hodnoty PD, GR i CAL statisticky významně vyšší ve všech skupinách pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami. Nejhorší stav parodontu (s největší klinickou ztrátou úponu) jsme pozorovali u pacientů s CP+T2DM, a to i přes fakt, že v této skupině bylo nejméně kuřáků a pacienti trpěli DM méně než polovinu let ve srovnání s pacienty s T1DM. Pacienti s T2DM však byli o více než patnáct let starší než osoby v ostatních skupinách. Zajímavým nálezem byly stejné koncentrace glykémie u pacientů s T1DM a T2DM, avšak výrazně vyšší hodnoty HbA1c u pacientů s T1DM. Zvýšená koncentrace triacylglycerolů a snížená hladina HDL cholesterolu u pacientů s T2DM odpovídá typickému obrazu „diabetické dyslipidémie“ [7].

Interleukin-1

Asociaci *IL-1A* -889C/T (rs1800587) polymorfismu u pacientů s CP s/bez DM v české populaci jsme neprokázali, což je v kontrastu s výsledky metaanalýzy Karimbuxy a kol. [19]. Dosud nebyla publikována práce zabývající se tímto polymorfismem u pacientů s T1DM, ale u pacientů s T2DM byla varianta v pozici -889 *IL-1A*, konkrétně alela T, asociována s vyšším rizikem T2DM u mužů, zatímco u žen měla tato minoritní alela opačný, tedy protektivní, ale rovněž signifikantní efekt [24].

Z výsledků naší studie vyplývá, že polymorfismus *IL-1B* +3953C/T (rs1143634) může hrát roli v etiopatogenezi CP v české populaci, kdy se alela T jeví jako protektivní. Tato pozorování podporují námi dříve zjištěnou asociaci C alely *IL-1B* +3953 polymorfismu s rizikem rozvoje CP [14]. Nicméně funkční význam SNPs *IL-1B* +3953C/T varianty v korelaci s produkcí *IL-1β* není ještě dostatečně zmapován a dosavadní studie poskytují kontroverzní výsledky [25]. U pacientů

s CP a DM jsme významný vztah ke studovanému *IL-1B* polymorfismu neprokázali, ačkoli Krikovský a kol. [20] považují T alelu u SNP *IL-1B* +3953 (označovanou také jako +3954) za rizikovou u dětí s T1DM. Alela T v pozici +3953 *IL-1B* genu byla také již dříve spojena s vyšší koncentrací glukózy v krvi u pacientů s DM [23] a Guzman a kol. [11] našli marginální vztah mezi polymorfismem v pozici +3953C/T *IL-1B* genu a výskytem parodontitidy v diabetické populaci. Struch a kol. [38] ve své práci uvádějí, že pacienti s T2DM mají zvýšené riziko CP, které dále narůstá při určité kombinaci variant *IL-1A/1B* genotypu. Nicméně v české populaci jsme statisticky významný rozdíl ve frekvenci tzv. „double genotypu“ složeného z *IL-1A* -889C/T a *IL-1B* +3953C/T SNPs mezi skupinami pacientů ve srovnání s kontrolami nenašli.

Vzhledem k tomu, že prozánětlivý potenciál *IL-1α* a *IL-1β* je regulován endogenními inhibitory, jakými je např. antagonist IL-1 receptoru, také variabilita v jeho genu by mohla hrát důležitou roli v etiopatogenezi daných onemocnění. V naší studii jsme však nezjistili významný vztah mezi *IL-1RN* (VNTR, 86 bp v intronu 2) variantami u pacientů s CP s/bez DM, což je v souladu s výsledky metaanalýzy od Ding a kol. [9], kde *IL-1RN* VNTR byl asociován pouze s agresivní, ne však s chronickou parodontitidou. V egyptské populaci byla frekvence krátké alely *IL-1RN**S a genotypu tvořeného kombinací dvou krátkých alel (tj. *IL-1RN*SS) nižší u pacientů s T1DM ve srovnání se zdravými kontrolami [34] a v indické populaci tuto krátkou alelu společně s *IL-1RN*SS genotypem asociovali s rizikem rozvoje T2DM [1, 5].

S našimi výsledky korespondují pozorování v chilské populaci, kdy López a kol. [22] neprokázali významné rozdíly v alelických ani genotypových frekvencích polymorfismů *IL-1A* -889C/T, *IL-1B* +3953C/T a *IL-1RN* VNTR mezi pacienty s CP s/bez T2DM, na

druhou stranu však potvrdili asociaci TT genotypů obou polymorfismů *IL-1A* -889C/T i *IL-1B* +3953C/T s výskytem CP. Domníváme se, že diskrepance mezi výsledky různých studií je zapříčiněna nejenom populačními rozdíly, ale především dosud nedostatečnou komplexností genetického vyšetření. Proto se přikláníme k haplotypové analýze, která, na rozdíl od analýz jednotlivých genových variant, poskytuje ucelenější pohled na vztah polymorfismů v *IL-1* genovém klastru k CP a DM.

Při srovnání haplotypových frekvencí se haplotyp TTL, složený z *IL-1A* -889C/T, *IL-1B* +3953C/T a *IL-1RN*S/L VNTR, zdá být protektivní k rozvoji CP. Předpokládáme, že dříve popsany „ochranný“ vliv T alely *IL-1B* +3953C/T polymorfismu na rozvoj CP v naší populaci, se uplatňuje také u TTL haplotypu u stejné skupiny pacientů. Určitou roli rovněž může hrát počet repetice v *IL-1RN* genu, neboť při porovnání frekvencí TTL a TTS haplotypů u pacientů s CP a zdravých kontrol je ten s krátkou alelou (2 repetice) v *IL-1RN* VNTR spíše rizikový pro rozvoj CP. U pacientů s kombinací CP a T1DM můžeme označit jako rizikový haplotyp CTL, zatímco CCL haplotyp zvyšuje riziko vzniku CP a T2DM. Z důvodu rozdílné etiopatogeneze onemocnění T1DM a T2DM nejsou výsledky haplotypové analýzy překvapující.

Interleukin-6

Také polymorfismy v promotoru genu *IL-6* jsou kvůli jejich možnému vlivu na míru exprese tohoto cytokinu [41] intenzivně zkoumány. Metaanalýza několika studií potvrdila asociaci *IL-6* -174G/C (rs1800795) polymorfismu s CP pouze u brazilské populace, zatímco alela G *IL-6* -572G/C (rs1800796) varianty byla spojena s rizikem rozvoje CP bez závislosti na etnicitě populace [36]. V naší studii jsme neprokázali vztah jednotlivých alel či genotypů SNPs *IL-6* -174G/C (rs1800795), -572G/C (rs1800796) a -597G/A (rs1800797) k rozvoji CP u pacientů s/bez DM. V čínské populaci byla protektivním faktorem pro CP s T2DM alela C polymorfismu *IL-6* -572G/C (rs1800796) [42] a u indické populace alela A polymorfismu *IL-6* -597G/A (rs1800797) [35]. Rozdílné výsledky jednotlivých studií mohou být dány jednak odlišnou frekvencí polymorfismů v různých populacích a také tím, že se nebere v potaz možnost vzájemného ovlivňování jednotlivých SNPs. Polymorfismy totiž nemusí při transkripci *IL-6* genu působit aditivně, ale spíše skrze složité interakce definované haplotypem [41].

Ačkoliv jsme u skupin pacientů s kombinací obou onemocnění (tj. s CP s T1DM/T2DM) nepozorovali signifikantní rozdíly ve frekvencích *IL-6* haplotypů, haplotyp G(-174)/G(-572)/G(-597) byl v naší studii spojen

s rizikem rozvoje CP. Jelikož je patogeneze parodontitidy spojena se zvýšenou hladinou *IL-6* [39], mohl by být haplotyp GGG v porovnání s ostatními haplotypy více transkripčně aktivní. Tento předpoklad je v souladu s experimentem, při kterém konstrukty s haplotypem GGG transfekované do buněk a následně stimulované *IL-1* vykazovaly oproti ostatním konstruktům s odlišnými haplotypy vyšší transkripci [41]. Výsledky pokusů zabývající se u zdravých jedinců s různými haplotypy koncentrací *IL-6* v plné krvi po stimulaci LPSs jsou protichůdné. Müller-Steinhardt a kol. [26] naměřili při tomto experimentu u homozygotních nositelů genotypu GGG v porovnání s ostatními genotypy nižší množství produkovaného *IL-6*. V kontrastu s touto studií je práce od Rivera-Chavez a kol. [31], kteří pozorovali u homozygotů GGG ve srovnání s ostatními genotypy vyšší hladinu *IL-6*, což je v souladu s našimi závěry. Rozporuplné výsledky výše zmíněných dvou studií mohou být způsobeny použitím různých protokolů pro inkubaci, stimulaci plné krve, měření koncentrace *IL-6* či existencí jiných než zkoumaných SNPs podílejících se na expresi *IL-6*. Dalším limitem těchto pokusů je jejich *ex vivo* provedení, tudíž se mimo jiné nezohledňuje vliv polymorfismu Asp358Ala (+48892A/C, rs2228145) v genu pro receptor *interleukinu-6* (*IL-6R*), který *in vivo* zvyšuje hladinu *IL-6* v plazmě [30].

Limitací naší studie je počet pacientů s CP a současně s DM, což je důsledek relativně přísných kritérií, která pro zařazení do této podskupiny dodržujeme. Nízké počty zahrnutých pacientů v těchto skupinách, mohou být důvodem negativních výsledků z důvodu nízké „síly testu“. Na druhou stranu jsou jedinci, zahrnutí do skupin pacientů a zdravých kontrol, velmi dobře anamnesticky a klinicky vyšetřeni, studovaná kohorta je etnicky homogenní a velikost souboru pacientů s CP bez DM a osob bez parodontitidy je v porovnání s jinými studiemi tohoto charakteru výrazně větší.

ZÁVĚR

Závěrem lze říci, že polymorfismus +3953C/T (rs1143634) v *IL-1B* genu může ovlivňovat náchylnost k CP v české populaci, avšak pro ucelenější pochopení vlivu variability ve studovaných genech vybraných cytokinů je vhodnější haplotypová analýza. Určité haplotypy v *IL-1* a *IL-6* genech lze považovat za rizikové, či naopak protektivní při rozvoji daných onemocnění. Domníváme se, že výsledky naší práce mohou být využity k lepšímu porozumění vztahu mezi CP a DM na molekulární úrovni a v budoucnu přispějí ke zlepšení diagnostiky, případně terapie těchto komplexních chorob.

LITERATURA

- Achyut, B. R., Srivastava, A., Bhattacharya, S., Mittal, B.:** Genetic association of interleukin 1beta (-511C/T) and interleukin-1 receptor antagonist (86 bp repeat) polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in North Indians. *Clin. Chim. Acta*, roč. 377, 2007, č. 1–2, s. 163–169.
- Armitage, G. C.:** Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol.*, roč. 4, 1999, č. 1, s. 1–6.
- Atieh, M. A., Faggion, C. M., Seymour, G. J.:** Cytokines in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, roč. 104, 2014, č. 2, s. 38–45.
- Bascones-Martínez, A., González-Febles, J., Sanz-Esporrín, J.:** Diabetes and periodontal disease. Review of the literature. *Am. J. Dent.*, roč. 27, 2014, č. 2, s. 63–67.
- Bid, H. K., Konwar, R., Agrawal, C. G., Banerjee, M.:** Association of IL-4 and IL-1RN (receptor antagonist) gene variants and the risk of type 2 diabetes mellitus: a study in the north Indian population. *Indian J. Med. Sci.*, roč. 62, 2008, č. 7, s. 259–266.
- Bulut, U., Develioglu, H., Taner, I. L., Berker, E.:** Interleukin-1 beta levels in gingival crevicular fluid in type 2 diabetes mellitus and adult periodontitis. *J. Oral Sci.*, roč. 43, 2001, č. 3, s. 171–177.
- Češka, R.:** Dyslipidémie u osob s diabetem 2. typu a její léčba. *Kap. Kardiol.*, roč. 3, 2011, č. 3, s. 97–101.
- Dinarello, C. A.:** The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.*, roč. 20, 2002, č. 5, s. 1–13.
- Ding, C., Zhao, L., Sun, Y., Li, L., Xu, Y.:** Interleukin-1 receptor antagonist polymorphism (rs2234663) and periodontitis susceptibility: a meta-analysis. *Arch. Oral Biol.*, roč. 57, 2012, č. 6, s. 585–593.
- Erbağci, A. B., Tarakcioğlu, M., Coşkun, Y., Sivasli, E., Sibel Namiduru, E.:** Mediators of inflammation in children with type I diabetes mellitus: cytokines in type I diabetic children. *Clin. Biochem.*, roč. 34, 2001, č. 8, s. 645–650.
- Guzman, S., Karima, M., Wang, H. Y., Van Dyke, T. E.:** Association between interleukin-1 genotype and periodontal disease in a diabetic population. *J. Periodontol.*, roč. 74, 2003, č. 8, s. 1183–1190.
- Chan, H. H., Rahim, Z. H., Jessie, K., Hashim, O. H., Taiyeb-Alli, T. B.:** Salivary proteins associated with periodontitis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 13, 2012, č. 4, s. 4642–4654.
- Chapple, I. L. C., Genco, R.:** Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J. Clin. Periodontol.*, roč. 40, 2013, Suppl. 14, s. 106–112.
- Izakovičová Hollá, L., Dvořáková, N., Halaba, T., Znojil, V., Vácha, J., Vaněk, J.:** Analýza polymorfismů v genech pro interleukin-1 (IL-1) u českých pacientů s chronickou parodontitidou. *Čes. Stomat.*, roč. 104, 2004, č. 2, s. 48–56.
- Izakovičová Hollá, L., Fassmann, A., Stejskalová, A., Znojil, V., Vaněk, J., Vácha, J.:** Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, roč. 75, 2004, č. 1, s. 30–36.
- Izakovičová Hollá, L., Bořilová Linhartová, P., Hrdličková, B., Marek, F., Dolina, J., Řihák, V., Kala, Z.:** Haplotypes of the IL-1 gene cluster are associated with gastroesophageal reflux disease and Barrett's esophagus. *Hum. Immunol.*, roč. 74, 2013, č. 9, s. 1161–1169.
- Jiang, Z. L., Cui, Y. Q., Gao, R., Li, Y., Fu, Z. C., Zhang, B., Guan, C. C.:** Study of TNF- α , IL-1 β and LPS levels in the gingival crevicular fluid of a rat model of diabetes mellitus and periodontitis. *Dis. Markers*, roč. 34, 2013, č. 5, s. 295–304.
- Kamagata, Y., Miyasaka, N., Inoue, H., Hashimoto, J., Iida, M.:** Study of cytokine production in inflamed human gingival tissues in periodontitis. Interleukin-1 (IL-1 alpha, beta) and tumor necrosis factor (TNF alpha). *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi*, roč. 31, 1989, č. 3, s. 843–848.
- Karimbux, N. Y., Saraiya, V. M., Elangovan, S., Allareddy, V., Kinnunen, T., Kornman, K. S., Duff, G. W.:** Interleukin 1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. *J. Periodontol.*, roč. 83, 2012, č. 11, s. 1407–1419.
- Krikovskiy, D., Vásárhelyi, B., Treszl, A., Körner, A., Tordai, A., Tulassay, T., Madácsy, L.:** Genetic polymorphism of interleukin-1beta is associated with risk of type 1 diabetes mellitus in children. *Eur. J. Pediatr.*, roč. 161, 2002, č. 9, s. 507–508.
- Kristiansen, O. P., Mandrup-Poulsen, T.:** Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes*, roč. 54, 2005, s. 114–124.
- López, N. J., Venezuela, C. Y., Jara, L.:** Interleukin-1 gene cluster polymorphisms associated with periodontal disease in type 2 diabetes. *J. Periodontol.*, roč. 80, 2009, č. 10, s. 1590–1598.
- Luotola, K., Pääkkönen, R., Alanne, M., Lanki, T., Moilanen, L., Surakka, I., Pietilä, A., Kähönen, M., Nieminen, M. S., Kesäniemi, Y. A., Peters, A., Jula, A., Perola, M., Salomaa, V., Health 2000 AIRGENE Study Groups:** Association of variation in the interleukin-1 gene family with diabetes and glucose homeostasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, roč. 94, 2009, č. 11, s. 4575–4583.
- Luotola, K., Pietilä, A., Zeller, T., Moilanen, L., Kähönen, M., Nieminen, M. S., Kesäniemi, Y. A., Blankenberg, S., Jula, A., Perola, M., Salomaa, V., Health 2000 Study, FINRISK97 Study.** Association between interleukin-1 (IL-1) gene variations of IL-1 receptor antagonist and the development type 2 diabetes. *J. Intern. Med.*, roč. 269, 2011, č. 3, s. 322–332.
- Mark, L. L., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Kent, R. L., Guerrero, D., Kornman, K., Newman, M., Stashenko, P.:** Effect of the interleukin-1 genotype on monocyte IL-1beta expression in subjects with adult periodontitis. *J. Periodontol.*, roč. 35, 2000, č. 8, s. 172–177.
- Müller-Steinhardt, M., Ebel, B., Härtel, C.:** The impact of interleukin-6 promoter -597/-572/-174 genotype on interleukin-6 production after lipopolysaccharide stimulation. *Clin. Exp. Immunol.*, roč. 147, 2007, č. 2, s. 339–345.
- Odegaard, J. I., Chawla, A.:** Connecting type 1 and type 2 diabetes through innate immunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, roč. 2, 2012, č. 3, a. 007724. doi:10.1101/cshperspect.a007724.
- Poskerová, H., Bořilová Linhartová, P., Vokurka, J., Fassmann, A., Izakovičová Hollá, L.:** Diabetes a orální zdraví. *Čes. Stomat.*, roč. 114, 2014, č. 5, s. 75–86.
- Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E., Ridker, P. M.:** C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, roč. 286, 2001, č. 3, s. 327–334.
- Rafiq, S., Frayling, T. M., Murray, A., Hurst, A., Stevens, K., Weedon, M. N., Henley, W., Ferrucci, L., Bandinelli, S., Corsi, A.-M., Guralnik, J. M., Melzer, D.:** A common variant of the interleukin 6 receptor (IL-6r) gene increases IL-6r and IL-6 levels, without other inflammatory effects. *Genes Immun.*, roč. 8, 2007, č. 7, s. 552–559.
- Rivera-Chavez, F. A., Peters-Hybki, D. L., Barber, R. C., O'Keefe, G. E.:** Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses. *Shock (Augusta, Ga.)*, roč. 20, 2003, č. 3, s. 218–223.

Genová variabilita v imunoregulačních faktorech u pacientů s chronickou parodontitidou a diabetes mellitus

- 32. Salvi, G. E., Beck, J. D., Offenbacher, S.:** PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann. Periodontol.*, roč. 3, 1998, č. 1, s. 40–50.
- 33. Santos Tunes, R., Foss-Freitas, M. C., Nogueira-Filho Gda, R.:** Impact of periodontitis on the diabetes-related inflammatory status. *J. Can. Dent. Assoc.*, roč. 76, 2010, s. 35.
- 34. Settin, A., Ismail, A., El-Magd, M. A., El-Baz, R., Kazamel, A.:** Gene polymorphisms of TNF-alpha-308 (G/A), IL-10(-1082) (G/A), IL-6(-174) (G/C) and IL-1Ra (VNTR) in Egyptian cases with type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*, roč. 42, 2009, č. 1, s. 50–55.
- 35. Sharma, N., Joseph, R., Arun, R., Chandni, R., Srinivas, K. L., Banerjee, M.:** Cytokine gene polymorphism (interleukin-1 β +3954, Interleukin-6 [-597/-174] and tumor necrosis factor- α -308) in chronic periodontitis with and without type 2 diabetes mellitus. *Indian J. Dent. Res.*, roč. 25, 2014, č. 3, s. 375–380.
- 36. Song, G. G., Choi, S. J., Ji, J. D., Lee, Y. H.:** Association between tumor necrosis factor- α promoter -308 A/G, -238 A/G, interleukin-6 -174 G/C and -572 G/C polymorphisms and periodontal disease: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.*, roč. 40, 2013, č. 8, s. 5191–5203.
- 37. Steinkasserer, A., Spurr, N. K., Cox, S., Jeggo, P., Sim, R. B.:** The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. *Genomics*, roč. 13, 1992, č. 3, s. 654–657.
- 38. Struch, F., Dau, M., Schwahn, C., Biffar, R., Kocher, T., Meisel, P.:** Interleukin-1 gene polymorphism, diabetes, and periodontitis: results from the Study of Health in Pomerania (SHIP). *J. Periodontol.*, roč. 79, 2008, č. 3, s. 501–507.
- 39. Takahashi, K., Takashiba, S., Nagai, A., Takigawa, M., Myoukai, F., Kurihara, H., Murayama, Y.:** Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodontol.*, roč. 65, 1994, č. 2, s. 147–153.
- 40. Taylor, J. J., Preshaw, P. M., Lalla, E.:** A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J. Clin. Periodontol.*, roč. 40, 2013, Suppl. 14, s. 113–134.
- 41. Terry, C. F., Loukaci, V., Green, F. R.:** Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, roč. 275, 2000, č. 24, s. 18138–18144.
- 42. Xiao, L. M., Yan, Y. X., Xie, C. J., Fan, W. H., Xuan, D. Y., Wang, C. X., Chen, L., Sun, S. Y., Xie, B. Y., Zhang, J. C.:** Association among interleukin-6 gene polymorphism, diabetes and periodontitis in a Chinese population. *Oral Dis.*, roč. 15, 2009, č. 8, s. 547–553.

ČESKÁ
STOMATOLOGIE
ročník 115,
2015, 4,
s. 89–97

Tato studie byla podpořena granty IGA NT11405-6, GA ČR GB14-37368G, a projektem MUNI/A/1359/2014.

Mgr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D.
Ústav patologické fyziologie LF MU
Kamenice 5
625 00 Brno
e-mail: plinhart@med.muni.cz