

Středoškolská odborná činnost 2008/2009

Obor 04 – Biologie

Analýza vztahu polymorfizmů kandiátních genů k obezitě

Autor:

Lukáš Pešák

3. ročník

Gymnázium Vyškov

Komenského nám. 16

682 01 Vyškov

Jihomoravský kraj

Konzultant práce:

Doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

Ústav biochemie

Přírodovědecká fakulta

Masarykovy univerzita

Brno

Vyškov, 2009

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci vypracoval samostatně pod vedením pana Doc. RNDr. Omara Šerého, Ph.D. Uvedl jsem veškerou použitou literaturu.

Ve Vyškově dne 10.3. 2009

Lukáš Pešák

Poděkování

Tato práce byla realizována na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Mým konzultantem byl Doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D., kterému bych rád na tomto místě poděkoval za odborné rady a spoustu nových zkušeností. Stejně tak děkuji MUDr. Daně Maňaskové, která nám poskytla vzorky obézních žen, na jejichž odběru jsem měl tu možnost se také zčásti podílet v rámci akce pořádané organizací STOB. Mgr. Lukášovi Častulíkovi děkuji za asistenci při izolaci DNA a následných analýzách. Dále také děkuji Jihomoravskému centru pro mezinárodní mobilitu, které tuto práci financovalo a Mgr. Jitce Hrežové a Mgr. Martě Kubačákové za dlouhodobou podporu.

Abstrakt

Úvod: Na aktuální celosvětový problém zvaný obezita je třeba pohlížet jako na komplexní multifaktoriální chorobu, která je kromě našeho genotypu silně ovlivněna prostředím a životním stylem. Mezi přední kandidáty patří mimo jiné i gen pro β 2-adrenergní receptor (ADRB2), který normálně funguje jako hlavní lipolytický faktor v lidských tukových buňkách. Tato práce se zaměřuje na vztah mezi polymorfizmem Gln27Gln genu pro ADRB2 a obezitou, protože u této varianty byl již v některých populacích zaznamenán vztah s vyššími hodnotami BMI a dalšími charakteristickými znaky obezity. Rovněž nás zajímal polymorfismus rs1889018 SREBF1c genu. U tohoto transkripčního faktoru, jehož produkt je hlavním regulátorem metabolismu uhlovodíků a lipidů, byla provedena zatím pouze jediná studie analyzující vztah některých polymorfizmů s obezitou. Námi zvolený polymorfismus však žádná populační studie do vztahu s obezitou nedávala.

Metodika: Provedli jsme asociační studii české populace obézních (BMI hranice $>27\text{kg/m}^2$) i neobézních žen ($n=120$) a mužů ($n=81$). Použili jsme k tomu měření antropometrická a měření bioelektrického odporu (BIA) zjišťujícího složení těla. Pomocí PCR–RFLP analýzy jsme detekovali polymorfismus na 27. kodonu ADRB2 genu a také polymorfismus rs1889018 poblíž 5' konce SREBF-1 genu. Data jsme vyhodnotili v softwaru CSS Statistica analýzou rozptylu. Výsledky jsme porovnávali s publikovanými údaji.

Výsledky: Nenalezli jsme asociaci mezi polymorfizmem ADRB2 genu s BMI, hmotností, obvodem pasu ani dalšími měřenými znaky ($P>0.05$). V případě analýzy polymorfizmu SREBP-1c genu jsme zjistili vztah mezi polymorfizmem rs1889018 a hmotností (95% CI, $p=0.004$, 83.3 vs. 69.9), BMI ($p=0.002$, 95% CI, 27.1 vs. 23.4) a obvodem pasu ($p=0.012$, 95% CI, 91.9 vs. 82.1). Mutantní alela se vyskytovala častěji u obézních jedinců (OR 0.84) než normální alela (OR=0.48).

Závěr: Polymorfismus Gln27Gln ADRB2 genu se u české populace nepodílí na vzniku a rozvoji obezity. Toto zjištění potvrzuje výsledek meta-analýzy publikovaných studií. Vztah s obezitou byl místo toho zjištěn u rs1889018 polymorfizmu genu pro SREBF1. Je zapotřebí provést řadu dalších populačních studií, které by potvrdily tento nalezený vztah.

Seznam použitých zkratk

5'konec / 3'konec	Konec DNA vlákna zakončený 5' nebo 3' uhlíkem pětiuhlíkatého cukru.
5q31-q32	5. chromozom, delší raménko, poloha 31, na antiparalelním řetězci 32
A	majoritní alela polymorfizmu rs1889018
ADRB2	Beta-2-adrenergic receptor , hlavní lipolytický faktor v lidských tukových buňkách
ANOVA	analýza rozptylu - zkoumá závislost kvantitativní proměnné na třídícím klasifikačním faktoru (kategoriální proměnná anebo kvantitativní s malým počtem obměn)
Arg16Gly	Polymorfizmus na 16.kodonu ADRB2 genu, záměna argininu za glycin
BIA	Bioelectric Impedance Analysis je metoda měření tělesného tuku tím, že se měří odpor pomocí elektrických proudů procházejících tělem. Elektrina tělem proudí skrze tělesnou vodu, která má vysoké vodivé vlastnosti a odpor měřeného těla se tak mění v závislosti na množství tělesné vody. Analyzátor tělesného složení za pomoci metody BIA měří tělesnou vodu na základě předpokladu, že tělo je válec.
BMI	Boddy mass index je metoda zjišťování obezity; vypočítá se jako podíl jedincovy váhy (kg) a výšky (m) na druhou.
C	majoritní alela polymorfizmu rs1042713
CI	confidence interval , interval spolehlivosti, že u daného genotypu se vyskytuje daná hodnota
CNS	centrální nervový systém tzn. mozek, mícha.
CSF1	colony-stimulating factor 1 , účinkuje při imunologické obraně, kostním metabolismu, odstranění lipoproteinů, fertilitě a těhotenství
DNA	deoxyribonucleic acid , kyselina deoxyribonukleová.
FAT	hmotnost tělesného tuku (v kg)
FAT%	procento tuku v těle z celkové hmotnosti organismu.
G	mutantní alela polymorfizmu rs1042713 ADRB2 genu
Glu27Gln	Polymorfizmus na 27. kodonu ADRB2 genu, záměna glutaminu za glutamickou kyselinu
HDL	High-density lipoproteins , lipoprotein umožňující lipidům (cholesterol, triglyceridy) jejich transport v krevním proudu. U zdravých jedinců je asi 30% krevního cholesterolu neseného pomocí HDL.
HDL-C	high-density lipoprotein cholesterol
HLA antigeny	The human leukocyte antigen system
J	joule - jednotka energie, 1joule= 0.2388459 kalorií
L2/Z	Pokud chceme změřit tělesnou vodu metodou BIA, musíme zjistit impedanci (odpor) a výšku (délku). To je označováno jako impedanční index (L2/Z). S pomocí vypočítaného množství tělesné vody lze zjistit množství bez tukové hmoty.
LDK	levá dolní končetina
LDL	Low-density lipoprotein , lipoprotein podílející se na transportu cholesterolu a triglyceridů z jater do periferních tkání
LDLR	The low density lipoprotein receptor je receptor na povrchu buňky, podílí se na homeostázi cholesterolu
n	počet subjektů
OR	odds of ratio , podíl jedinců postižených chorobou / zdravých /
PCR	Polymerase chain reaction - metoda umožňující zvýšit mnohokrát množství zvoleného úseku DNA bez nutnosti klonovat DNA, ani oddělovat sekvenci od zbytku řetězce
PCR-RFLP	A restriction fragment length polymorphism je variace v DNA sekvenci genomu, která může být detekována rozštěpením na kousky s použitím restričních enzymů a analýzou délky výsledných fragmentů pomocí gelové elektroforézy
PDK	pravá dolní končetina
rs1042713	Glu27Gln polymorfizmus ADRB2 genu
rs1889018	polymorfizmus 5'7796T>C SREBF1c genu
SF8	8 kožních řasna lidského těla, slouží ke zjištění, zda máme v těle nadbytek tuku; měří se kaliperem.
SNP	single nucleotide polymorphism , jednonukleotidový polymorfizmus, který vzniká záměnou jednoho nukleotidu určitého genu
SREBF1	Sterol regulatory element-binding protein-1 , hlavní regulátor metabolismu uhlovodíků a lipidů
Taq polymeráza	slouží při PCR, spouští syntézu nové DNA od 3' konce primeru, funguje při vysokých teplotách
G	mutantní alela rs1889018 polymorfizmu SREBF1c genu
VNTR	Variable number of tandem repeats - krátké opakující se sekvence, jako CACACA..., které se nacházejí v odlišných pozicích (lokusech) lidského genomu. Počet repetice na každém jednotlivém vlákně se může velmi lišit v rámci, v rozsahu od 4 do 40 různých individuů. Opakující se nukleotidy tohoto typu jsou označovány - Hypervariabilní mikrosatelity neboli VNTR (variable number of tandem repeat) sekvence.
vs	versus - porovnání s něčím
WHO	Světová zdravotnická organizace
WHR	waist to hip ratio , poměr obvodu pasu a boků, sloužící ke zjištění androidního typu obezity typu obezity; hranicí je u mužů poměr nad 1,0 a u žen nad 0,8 nebo 0,85

Obsah

1 ÚVOD	7
1.1. CÍLE PRÁCE.....	7
1.2. OBEZITA	7
1.2.1. FYZIOLOGIE HOMEOSTÁZI TĚLESNÉ VÁHY.....	8
1.2.1.1. ŘÍZENÍ PŘÍJMU POTRAVY.....	8
1.2.1.2. HYPOTALAMICKÁ CENTRA	9
1.2.2. DETEKCE OBEZITY.....	11
1.2.2.1. BMI	11
1.2.2.2. OBVOD PASU.....	12
1.2.2.3. BIA	12
1.2.2.4. DALŠÍ METODY.....	12
1.2.3. TYPY OBEZITY A JEJICH NÁSLEDKY.....	13
1.2.3.1. TYP JABLKO - NEBOLI MUŽSKÝ TYP OBEZITY.....	13
1.2.3.2. TYP HRUŠKA - NEBOLI ŽENSKÝ TYP OBEZITY.....	14
1.3. ASOCIAČNÍ STUDIE.....	14
1.3.1. POLYMORFIZMUS.....	14
1.3.2. PCR	15
1.3.3. ASOCIAČNÍ STUDIE.....	16
1.4. BETA-2-ADRENERGNI RECEPTOR.....	17
1.4.1. STUDIE S POZITIVNÍ ASOCIACÍ	19
1.4.2. STUDIE S ČÁSTEČNOU ASOCIACÍ.....	20
1.4.3. STUDIE S NEGATIVNÍ ASOCIACÍ.....	22
1.5. STEROL REGULATORY ELEMENT-BINDING TRANSCRIPTION FACTOR 1.....	23
2 METODIKA	24
2.1. DESIGN STUDIE.....	24
2.2. BIOLOGICKÁ MĚŘENÍ.....	25
2.3. GENETICKÁ ANALÝZA	25
2.3.1. IZOLACE GENOMICKÉ DNA ZE STĚRU Z BUKÁLNÍ SLIZNICE.....	25
2.3.2. DETEKCE POLYMORFIZMU RS1042714, ZÁMĚNA C/G V PEPTIDOVÉM ŘETĚZCI GENU PRO ADRB2	26
2.3.3. DETEKCE POLYMORFIZMU RS1889018, ZÁMĚNA C/T V PEPTIDOVÉM ŘETĚZCI GENU PRO SREBF1	26
2.4. STATISTICKÁ ANALÝZA.....	27
2.4.1. ANALÝZA ROZPTYLU (ANOVA)	27
2.4.2. KORELACE - KORELAČNÍ KOEFICIENT.....	27
2.4.3. POVRCHOVÉ 3D GRAFY.....	27
3 VÝSLEDKY	28
3.1. rs1042714.....	28
3.2. rs1889018.....	31
4 DISKUSE.....	32
5 ZÁVĚR.....	33
6 LITERATURA.....	33
6.1. POUŽITÁ LITERATURA.....	33
6.2. STUDIE GLU27GLN POLYMORFIZMU ADRB2 GENU.....	34
6.3. STUDIE POLYMORFIZMŮ SREBF-1 GENU	35
7 PŘÍLOHY.....	36
7.1. DOTAZNÍK.....	36
7.2. ANOVA.....	38
7.2.1. ADRB2.....	38
7.2.2. SREBF-1.....	39
7.3. 3D POVRCHOVÉ GRAFY.....	41
7.4. SROVNÁVÁNÍ HODNOT MUŽI VS. ŽENY	45
7.5. IZOLAČNÍ KIT ULTRACLEAN™ BLOOD SPIN DNA.....	46

1 Úvod

1.1. Cíle práce

Naše práce zjišťuje, zda existuje vztah mezi Glu27Gln polymorfizmem genu kódujícího ADRB2 a obezitou u českých mužů a žen. Získané výsledky potom porovnáváme s již publikovanými studiemi stejného zaměření (viz. Literatura). Hledáme tak s Čechy srovnatelnou populaci, co se týče vlivu polymorfizmu a frekvence Glu27 alely. Zásadní je v současné době publikovaná meta-analýza autorů Jalba a kol. (2008), která shrnuje a vyhodnocuje 28 publikovaných asociačních studií analyzujících obézní jedince a kontrolní osoby.

Do analýzy jsme zařadili také rs1889018 polymorfizmus SREBF-1 genu, jež byl asociován prozatím pouze s diabetem 2. typu, což samo o sobě napovídá, že může existovat i vztah s obezitou.

Výsledek této práce může v budoucnosti posloužit jako pomocný diagnostický marker problémů spojených s obezitou, což v praxi vypadá tak, že pacientům, kteří podstoupí genetické vyšetření, navrhně lékař po obdržení genotypu další postup léčby nebo prevence.

Studium vlivu těchto polymorfizmů na patogenezi obezity nebylo v české populaci ještě provedeno a relevantní výsledky pro Českou republiku stále chybí. Z tohoto hlediska se studie jeví jako velice zajímavá, protože Česká republika, co se týče výskytu obezity, patří bohužel mezi přední státy Evropy.

1.2. Obezita

Obezita je onemocnění způsobené dlouhodobou pozitivní energetickou bilancí vedoucí k nadměrnému nahromadění triglyceridu v těle na vybraných lokalitách (androidní, gynoidní atd.). Výjimečně se jedná o endokrinní poruchy žláz s vnitřní sekrecí, nadledvin, štítné žlázy, podvěsku mozkového. Interaguje vždy citlivý genotyp, který určuje naši fyziologii a metabolismus; s prostředím, který je dán jídelníčkem, výdejem, soc. postavením a kulturou.

Současná celosvětová epidemie obezity se mohla vyvinout jednak v důsledku změny genotypu, jednak v důsledku změny životního stylu. Současná strava je charakterizována vysokou energetickou hodnotou, na níž se podílí obrovská spotřeba tučných jídel, slazených nápojů, džusů, alkoholu; malá spotřeba zeleniny, ovoce a nízkotučných mléčných výrobků. Zanedbávané jsou rovněž tzv. "skryté tuky" v mléčných, masných výrobcích a alkoholu.

Pozn. Podle údajů světové zdravotnické organizace (WHO) průměrný denní příjem na hlavu stoupl z 9660 kJ v roce 1963, na 10 250kJ v roce 1971 a na 11 420kJ v roce 1992. V roce 2010 má podle odhadů dosáhnout průměrný denní příjem na hlavu 12 200kJ.

(Hainer a kol., 2004)

Příčinou malého energetického výdeje není jen pokles času věnovaného cvičení, nýbrž také automatizace mechanických prací, navyklé pohybové aktivity, využívání dopravních prostředků, způsob komunikace, pracovní aktivity, sedavý způsob života. Na rozvoji obezity se rovněž podílí stresové faktory, pracovní a rodinné problémy, infekce (např. adenoviry), málo spánku, zvýšená teplota v přibýtcích v zimním období, klimatizace v teplých klimatických podmínkách, kouření a v neposlední řadě i cílený výběr obézních partnerů k manželskému sňatku (obézní se žení a vdávají s obézními). *(Perušicová, 2007; MCPhee a kol., 2005)*

Pokud jsou oba rodiče obézní, je pravděpodobnost výskytu obezity u jejich potomka vyšší. Aktivní tělesná hmotnost roste do třetí dekády života, pak u mužů s přibývajícím věkem čím dál tím rychleji klesá. U žen je pokles do věku 50-55 nižší, pak se zrychluje. K výraznému nárůstu hmotnosti dochází u nich v těhotenství, po porodu a dále v období přechodu. S postupujícím věkem klesá také velikost bazálního metabolismu, a je proto zapotřebí omezit příjem potravy. Výška klidového metabolismu se podílí od 55-70% na celkové energetické bilanci za den. Stále častěji se však vyskytuje obezita u dětí, dospívajících a adolescentů, což je velký problém, protože vyváženost a kvalita stravy hraje v tomto

období velkou roli, při ukládání tuku v těle a formování dospělé postavy. Důležitá je pro ně změna stravovacích návyků, a to trvale (Gananong, 2002; Svačina, 2008).

Studiemi na jednovaječných a dvojvaječných dvojčatech bylo zjištěno, že genetická predispozice se na vzniku obezity může podílet ze 40-70%, u cukrovky 2. typu, s níž je obezita silně spjata, je tento vliv ještě větší. Je známo přes 30 genů, které ovlivňují:

- regulaci příjmu potravy, pocit hladu a sytosti
- jídelní chování a preference potravin
- vstřebávání a zpracování živin v gastrointestinálním traktu
- spalování živin
- energetický výdej (klidový, postprandiální) a úroveň spontánní pohybové aktivity
- hormony regulující energetickou rovnováhu (leptin, adiponektin, inzulin, neuropeptid Y, melanokortin)
- ukládání živin do energetických zásob
- rizika spojená s obezitou
- monogenní podmíněnost obezity - mutace jednoho genu pro leptin, leptinový receptor, proopiomelanokortin či melanokortinový receptor 4
- leptin na hypotalamické úrovni tlumí energetický příjem interakcí s orexigenními látkami

Je potřeba zmínit, že jsme nositeli tzv. "šetrných genů". Jako potomci populací, které přežily hladomory ve středověku, jsme schopni vyrovnat se s nedostatky energie potřebných k přežití v různých fázích vývoje. Nedokážeme se však vyrovnat se situací nadbytečného energetického příjmu a nedostatku pohybu. Energie bohužel nezmizí, ale uloží se do zásob v podobě tukové tkáně. (Perušicová, 2007; *Obezita.org*)

Onemocnění má tak velký výskyt, že je nemožné předpokládat, že by bylo léčitelné jen pomocí lékařů. Kdyby všichni obézní jedinci přišli k lékaři a dožadovali se konzultací o dietě a podání léků proti obezitě, znamenalo by to kolaps zdravotního systému. Přitom právě léčba obezity před vznikem dalších potíží je daleko levnější a efektivnější než např. léčba rozvinuté cukrovky 2. typu. Obezita se v současnosti podílí na přímých nákladech ve zdravotnictví 2-6%, podle některých odhadů až 8%. Současné propočty přímých nákladů však nezohledňují veškerá zdravotní rizika spojená s obezitou, takže skutečné přímé náklady budou bezpochyby větší. Zejména ve Spojených státech, obzvláště ve střední části, postihuje nadváha v průměru dva ze tří dospělých jedinců, z nichž jeden ze tří je obézní a jeden z dvanácti trpí cukrovkou (Perušicová, 2007, Svačina, 2003, Mourek, 2005).

Výskyt obezity je podle údajů získaných Svačinou (2002) ze studie Monica v ČR následující. U žen se udává nadváha ve 37%, obezita ve 31%, celkem pak nadváha i obezita u českých žen v 68%. U mužů má nadváhu 51%, obézních je 21%, celkově v ČR je 72% mužů obézních nebo s nadváhou. Pro srovnání, průměr pro Evropu je u žen 34/21 (nadváha/obezita), celkem 56%; u mužů 48/15 a dohromady 64%.

Důležité je pochopení mechanismů řídících signalizaci příjmu potravy. Pro prognózu obézních je nejdůležitější fyzická aktivita, přičemž obecně platí, že je lépe být obézní sportovec než stíhlý nespportovec. U obézních i mírná redukce hmotnosti o 5-10% významně omezuje další rizika. (Grofová, 2007)

1.2.1. Fyziologie homeostázi tělesné váhy

1.2.1.1. Řízení příjmu potravy

Lidský tuk zaujímá u zdravého muže přibližně 20-25% a u ženy 25-30% tělesné váhy. Udržování stálé tělesné hmotnosti u dospělých může probíhat v rozmezí měsíců až let, přičemž mluvíme o tzv. regulaci dlouhodobé (výživové), a ta je propojena s regulací krátkodobou (potravovou), vycházející z účinků příjmu potravy na trávicí trakt a z okamžitého stavu organismu - koncentrace živin v tělních tekutinách.

V případě, že se příjem energie vyrovná výdeji, udržuje si tělo svou stálou hmotnost. Toho je dosaženo řízením příjmu potravy, energetického výdeje (fyzická námaha), tělesné teploty a tělesné váhy.

To, co můžeme sami pociťovat, je návyk přijímat potravu pravidelně. V příslušný čas dostáváme hlad (bez vazby na aktuální nutriční stav organismu). Tento plánovaný příjem potravy závisí na tom, kdy a jak bohaté je další jídlo, a dokonce i na očekávaném výdeji energie. Regulační systémy se mění v průběhu věku jedince a ve spojitosti s některými onemocněními.

Hlad jsou všechny pocity vedoucí k požití potravy. Skládá se v první řadě z chuti - pocity téměř libé, spojené s žádostí těla po potravě, je spojena s gastrointestinálními reflexy (např. tvorba slin při pomyslení na chutné jídlo), a je ovlivňována i psychologicky. K jídlu nás také nutí subjektivně nepříjemné pociťování vjemů (hladové kontrakce žaludku) související s dlouhodobějším nedostatkem potravy a motivace k získání a požití potravy - motivace alimentární, potravní (Trojan, 2004).

1.2.1.2. Hypotalamická centra

Během dne dostáváme periodicky hlad a rychle se snažíme sníst tolik jídla, které víceméně vyrovná energetický výdej. Mozek všechny zmíněné aktivity koordinuje a centrální úlohu v tom hraje **hypotalamus** - seskupení regulačních center řídících homeostázi v našem těle. Ventromediální jádro hypotalamu slouží jako **centrum sytosti** a laterální část jako **centrum hladu**. Dohromady koordinují procesy řídící způsob našeho příjmu (řídí zpracování a uložení kalorií způsobem, aby udržel tělesnou váhu a zralost) a specifického vnímání přesycenosti a jsou také zapojeny do sekrece hormonů, která se mění v závislosti na metabolických požadavcích; obzvláště ze štítné žlázy, nadledvinových žláz a z buněk ostrůvků pankreatu.

Léze ve ventromediálním jádře u experimentálních zvířat vede ke smrtelné obezitě jako výsledku ničím neomezeného přejídání (*hyperfagie* - bulimie). To zahrnuje vzestup inzulínu v plazmě a inhibici lipolýzy. Naopak elektrické stimulace této oblasti mozku zapříčiňují zastavení příjmu potravy (*hypofagii* - anorexii) - zvyšuje se tonus sympatikum, tlumí sekrece inzulínu.

Laterální hypotalamus dostává signály z čichového, chuťového a zrakového systému a vnímá změny v koncentraci glukózy. Destruktivní léze v laterální části vedou k *hypofagii*, dokonce i v případě vyhladovění; elektrické stimulace zde spouští stravování, i když je organismus již nasycen. (Trojan, 2004, Lippincott, 2003)

Uvedená hypotalamická centra jsou informována z periferie:

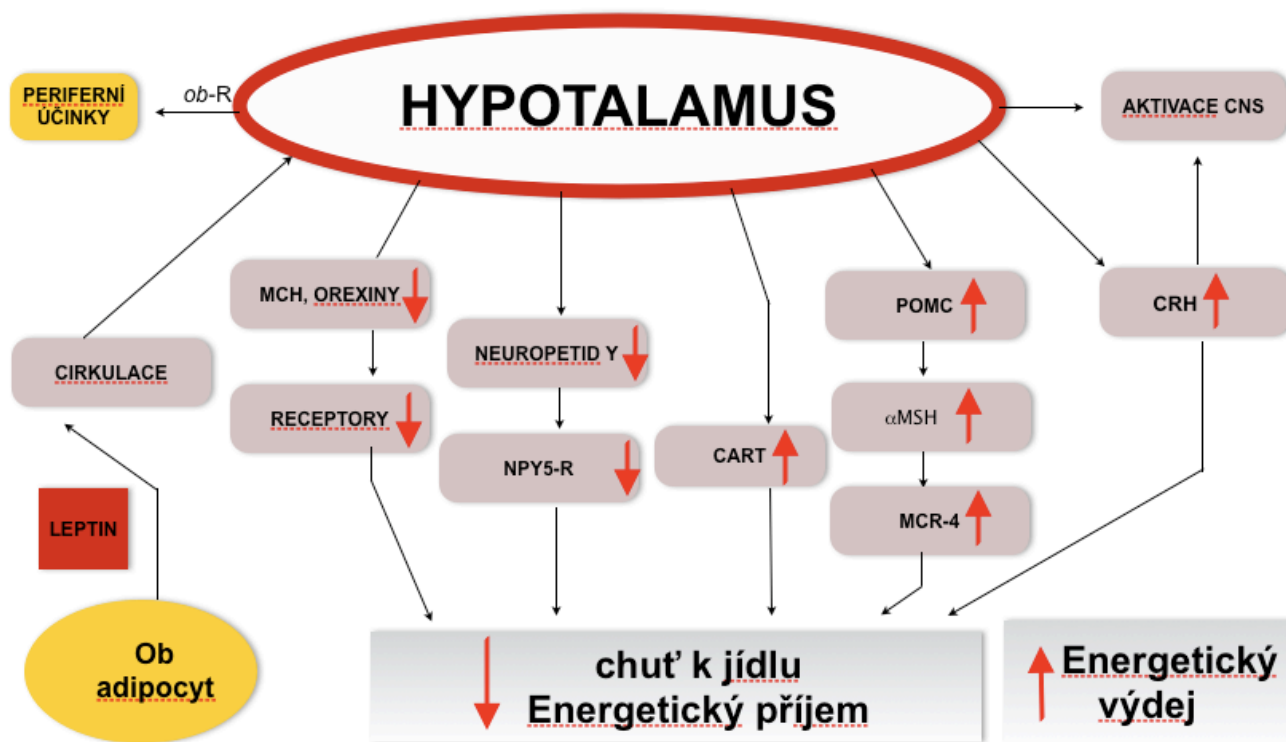
- ▶ hladové kontrakce žaludku - považují se za nejdůležitější informaci aktivizující centrum pro příjem potravy, naopak distence žaludku vede k pocitu sytosti;
- ▶ hladové podněty rovněž podporují příjem potravy a ve velkých vedrech naopak lidé ztrácejí chuť k jídlu;
- ▶ působení teploty krve protékající mozkiem: zvýšení teploty snižuje snahu po příjmu potravy a naopak. Za tradičně známé impulzy potravního chování se pokládají hladiny glykemie, případně i aminoacidemie krve protékající hypotalamem. Pokles systémové glykemie stimuluje příjem potravy;
- ▶ inhibiční či aktivační impulzy z vyšších oddílů CNS, především z mozkové kůry. Ty výrazně modifikují naše potravní chování, návyky, časový rozvrh příjmu potravy, "chuť" apod.; mozkový kmen řídí tvorbu slin, žvýkání, tvorbu sousta a polykání. Limbický systém se uplatňuje v motivačně-emočních dějích souvisejících s potravou;
- ▶ hormony gastrointestinálního traktu (cholecystokinin, bombesin) nebo další regulační molekuly výrazně modifikují naše potravní chování, pocit sytosti či hladu. Polypeptid leptin informuje o stavu tukových zásob a neuroleptin Y naopak příjem potravy výrazně stimuluje.

Klíčovým dlouhodobým regulátorem tělesné váhy je hormon *leptin*, který je uvolňován bílými tukovými buňkami - *adipocyty*. V případě, že množství tuku v těle vzroste, zvýší se i hladina plazmového **leptinu** a naopak. Leptin spolu s inzulínem potlačují ve vysokých koncentracích sekreci NPY (**Obr. 1**). Tím vyvolávají nechutenství a aktivaci sympatikum, čímž se zvyšuje spotřeba energie. Receptory pro leptin se vyskytují na povrchu nervových buněk hypotalamu a patří do rodiny receptorů pro cytokiny. Buňky v obloukovém jádře hypotalamu fungují jako senzory úrovně leptinu. Následná fyziologická odpověď na malé množství leptinu (hlad) iniciuje přes hypotalamus potřebu jíst, snižuje spotřebu energie,

omezuje reprodukční schopnosti, klesá tělesná teplota a roste parysempatická aktivita. V opačném případě (přesycenost) dojde k potlačení hladu, zvýší se spotřeba energie a s ní i sympatická aktivita.

Hypotalamické cesty zahrnující **neuropeptid Y** a melanokortin mají význam v regulaci pocitu hladu. Mutace receptoru pro melanokortin, tj. genu pro proopiomelanokortin, způsobuje výraznou nadváhu. Sama tuková tkáň vylučuje kromě leptinu také neesterifikované mastné kyseliny a cytokin nazývaný TNF-alfa “tumor necrosis factor alpha”. TNF-alfa je cytokin, který produkují také bílé krvinky, a který vyvolává hubnutí u nádorových onemocnění. Všechny tři proteiny jsou diskutovány jako možná příčina necitlivosti na inzulín. (Trojan, 2004; Svačina, 2003)

Obř. 1: ÚLOHA LEPTINU v regulaci energetické rovnováhy. Ob-ob gen kódující tvorbu leptinu v adipocytu, ob-R leptinový receptor, MCH melanin koncentrující hormon, NPY5-R druh receptoru pro neuropeptid Y, SNS sympatický nervový systém, POMC proopiomelanokortin, α -MSH α -melanocyty stimulující hormon (působí prostřednictvím MCR 4 a má opačný účinek než NPY), MCR-4 receptor melanokortinu typu 4, CART cocaine amphetamin receptor transcript.



Pozn. U dvou myší kmenů s extrémní obezitou a diabetes melitus 2. typu bylo objeveno po jednom defektním genu. Je-li defektní gen Ob(ezita), který je exprimován jen v bílé tukové tkáni, potom v plazmě chybí protein leptin, kódovaný právě genem ob. Injekce leptinu myši s homozygotní mutací genu ob normalizuje symptomy genového defektu. Naproti tomu mutace v genu db, tzn. je defektní leptinový receptor v hypothalamu. V plazmě sice cirkulují vysoké koncentrace leptinu, ale hypothalamus na ně nereaguje. U většiny lidí je častější zvýšená koncentrace leptinu v plazmě. (Podle Hainer a kol., 2004; Silbernagl, 2006)

Tabulka č.1: Látky sekretované tukovou tkání a jejich účinek

látky	účinky
leptin	potlačování hladu, ovlivňování reprodukce, energetického výdeje a hematopoézy
lipoproteinová lipáza	lipolýza
interleukin-6	aterogeneze, imunita, zánět
adipsin	chut' k jídlu
rezistence	inzulinorezistence
angiotenzinogen	hypertenze
TNF- α	inzulinorezistence

inhibitor t-PA 1	fibrinolýza
adiponektin	rezistence a endotelová dysfunkce
visfatin	inzulinový efekt
estrogeny	karcinogeneze a protekce proti osteoporóze
volné mastné kyseliny	orgánová steatosis, inzulin sekrece impairment
PAI-1	impairment of fibrolýzy
ADRB	regulace lipolýzy a termogeneze přes katecholaminy

(Svačina, 2008)

Na základě různých druhů chemických signálů přicházejících do CNS bylo vypracováno několik teorií aktivace a inhibice příjmu potravy:

- glukostatická - pokles hladiny glukózy v plazmě, zdroje energie nejen pro nervové buňky, vede k okamžitému příjmu potravy. Její vzestup způsobí zvýšení elektrické aktivity buněk v centru sytosti a poklesu aktivity v centru hladu. Podobně, avšak méně intenzivně, působí hladina aminokyselin.
- lipostatická - založená na reakci neuronů na hladinu volných mastných kyselin v tělesných tekutinách. Jejich průměrná hladina je přímo úměrná množství tukové tkáně. Nejedná se o akutní signál k příjmu potravy.
- termostatická - část energie potravy se přemění v teplo, které tlumí hlad (podobně jako zvýšení okolní teploty). Naopak snížení teploty hlad zvyšuje - dlouhodobé ukládání zásobního tuku.

(Svačina, 2003, Fölsch a kol., 2003)

1.2.2. Detekce obezity

1.2.2.1. BMI

Body Mass Index (BMI) je číslo vypočítané z jedincovy váhy a výšky (**Tabulka č. 2**). Jedná se o jednu z nejlepších a nejrychlejších metod. Není to však diagnostický nástroj. Osoba může mít například vysoké BMI, avšak pro zjištění, zda nárůst váhy znamená zdravotní riziko, je zapotřebí zhodnotit další údaje o pacientovi (viz. níže).

Tabulka č. 2: Výpočet BMI a vyhodnocení

Výpočet:

$$\text{váha (kg) / [výška (m)]}^2 \quad \text{nebo} \quad \text{váha (lb) / [výška (inch)]}^2 \times 703$$

Vyhodnocení:

BMI (kg/m²)	Kategorie	Zdravotní rizika
méne než 18.5	podváha	vysoká
18.5 - 24.9	norma	minimální
25.0 - 29.9	nadváha	nízká až lehce vyšší
30.0 - 34.9	obezita 1. stupně	zvýšená
35.0 - 39.9	obezita 2. stupně (závažná)	vysoká
40.0 a více	obezita 3. stupně (těžká, morbidní)	velmi vysoká

Pozn. Platí pro dospělé muže a ženy ve věku od dvaceti let. Výjimku tvoří trénovaní atleti s vyšším BMI (25 a více), kteří nemají nadváhu, jelikož nemají v těle přebytek tuku, nýbrž větší podíl svalstva. Pro děti a nezletilé je výsledek modulován pohlavím a věkem.

Nadváha je považována za předstupeň obezity. Zdravotní rizika stoupají již od BMI 25 a ostře od 27kg/m². Morbidní obezita je pak závažné onemocnění a osoby s takovou nadváhou nepřežívají většinou 60 let věku. Optimální prognóza bývá u BMI 20-22kg/m². Ženy vykazují větší množství tělního tuku než muži a starší lidé zase větší obvod pasu, než mladší dospěláci. (Sucharda, 2004; Center for disease control and prevention, 2008; Holeček, 2006)

1.2.2.2. Obvod pasu

O zdravotním riziku dobře informuje obvod těla uprostřed mezi dolními žebry a horní okrajem pánve u stojícího pacienta ve výdechu. Převaha tukové tkáně na trupu a uvnitř břicha je daleko nebezpečnější než ukládání na bocích a hýždích.

Tabulka č. 3: Hodnocení obvodu pasu

pohlaví	zvýšené riziko	vysoké riziko
muži	více než 94 cm	více než 102 cm
ženy	více než 80 cm	více než 88 cm

1.2.2.3. BIA

Měření bioelektrického odporu (*Bioelectric Impedance Analysis*) je rovněž relativně nenákladný prostředek na měření tělesného tuku. Měří se odpor pomocí elektrických proudů procházejících tělem. Elektřina tělem proudí skrze tělesnou vodu, která má vysoké vodivé vlastnosti a odpor měřeného těla se tak mění v závislosti na množství tělesné vody. Analyzátor tělesného složení za pomoci metody BIA měří tělesnou vodu na základě předpokladu, že tělo je válec. Tělesnou vodu ve válci lze vypočítat pomocí rovnic:

„odpor / délka“ a „objem = povrch x délka“

Pokud tedy chceme změřit tělesnou vodu metodou BIA, musíme zjistit impedanci (odpor) a výšku (délku). To je označováno jako impedanční index (L2/Z). S pomocí vypočítaného množství tělesné vody lze zjistit množství bez tukové hmoty a pokud od hmotnosti těla (celková hmotnost tělesného složení) odečteme tukovou hmotu, dostaneme aktivní hmotu (kosti a svaly).

Rozvržení tělesné hmoty a metabolické charakteristiky jsou však v pažích, nohách a trupu různé a pokud k těmto rozdílům není přihlíženo, stoupá možnost, že může dojít k chybě. Před vyvinutím tzv. *InBody* (8 elektrod) měřily analyzátoři tělesného složení jedinou impedanci pomocí přiložení elektrod na ruce a nohy („Měřením impedance těla jako celku“). Při analýze tělesného složení s použitím impedance těla jako celku nejsou ve výsledku brány v potaz rozdílnosti v metabolických charakteristikách trupu a údů.

Při analýze tělesného složení BIA je používána standardní frekvence 50 kHz. Frekvence 50 kHz však není schopna prostupovat buněčnou membránou, šíří se pouze mimobuněčnou tekutinou, proto není možné přesně měřit vnitrobuněčnou tekutinu. BIA je méně užitečná jako prostředek na měření úbytku tuku. (HYPERLINK "<http://www.healthshop.cz>" <http://www.healthshop.cz>)

1.2.2.4. Další metody

- ⇒ antropometrie
- ⇒ měření kožních řas kleštěmi (tzv. kaliper) nad tricemsem nebo pod lopatkou
- ⇒ vážení pod vodou, kdy zjistíme přesnou specifickou hmotnost těla
- ⇒ plethysmograf - stanovení objemu těla v hermeticky uzavřeném prostoru vyplněném vzduchem
- ⇒ počítačová tomografie
- ⇒ ultrazvuk
- ⇒ duální rentgenová absorpciometrie - vychází z odlišné absorpce záření o dvou různých energiích různými tkáněmi a stanovuje množství tukové tkáně v oblasti trupu ve srovnání s množstvím tuku na končetinách
- ⇒ nukleární magnetická rezonance
- ⇒ izotopické metody - založeny na stanovení celkového množství draslíku, což koreluje s buněčnou masou (Péruss a kol., 2005, Bel a kol., 2005, Hainer a kol., 2004).

1.2.3. Typy obezity a jejich následky

Konstitučně je organismus stavěn tak, aby především cirkulační aparát a opěrný systém (kosti a klouby) byly zatěžovány adekvátní tělesnou hmotností. Nadváha namáhá především opěrný aparát, znamenající předčasné opotřebení kloubních chrupavek dolních končetin. A zatížena je i jaterní a ledvinová tkáň, snižuje odolnost a adaptivnost organismu, zvyšuje nemocnost a je hned po kouření nejčastější příčinou úmrtí, kterému lze předcházet. Vysoké kardiometabolické riziko znamená hromadění tuku v oblasti břicha, hlavně kolem útrobu a na pobřišnici. Obezita s sebou nese i značné omezení běžného pohybu a také psychické následky, tzn. pocit méněcennosti, nižší společenské uplatnění, ekonomické nevýhody týkající se nemožnosti vykonávat určitá povolání, vysokého utrácení za potraviny a v neposlední řadě také omezená volba oděvů. Vzniká tak deprese i schizofrenie. Výrazná obezita vyznačující se nepřekonatelnou chutí k jídlu vzniká při poruše 15. chromozomu - Praderův-Williho syndrom (kromě obezity přítomna i hyperfagie, mentální a růstová retardace a hypotonie). (Mourek, 2005)

1.2.3.1. Typ jablko - neboli mužský typ obezity

Dochází k hromadění tuku v oblasti hrudníku a břicha, přičemž se jedná především o tuk viscerální. Uplatňuje se jak zvýšený tok volných mastných kyselin do portálního řečiště, tak zvýšená produkce zánětlivých cytokinů v abdominální tukové tkáni. Ke zjištění kardiometabolických rizik může posloužit změření obvodu pasu, které by u žen nemělo přesáhnout 80cm a u mužů 94cm.

Tabulka č. 4: Rizika androidního typu obezity

Metabolický syndrom X (Reavenův/syndrom inzulinorezistence)	<ul style="list-style-type: none"> • Inzulinorezistence • Hypertenze - vysoký krevní tlak • diabetes mellitus 2. typu - porucha glukózové tolerance - neboli na inzulínu nezávislá. Asi 80 – 90 % pacientů s cukrovkou 2. typu trpí nadváhou či obezitou • související onemocnění: hypertriglyceridemie hyperinzulinismus, (hlavně svaly), hyperlipoproteinemie (malé denzní LDL), snížení hladiny HDL cholesterolu, hyperglykemie, mikrovaskulární angína, poruchy koagulace a fibrinolýzy; aterogenní dyslipidemie, androidní obezita
syndrom polycystických ovarií a infertilita	typická inzulinorezistence, hyperandrogenismus a chronická anovulace; často i hirsutismus alopecie a akné
Pickwickův syndrom (syndrom obezita-hypoventilace)	<ul style="list-style-type: none"> • spánková apnoe - nejčastěji projev krátkodobé zástavy dechu ve spánku při chrápání poklesem měkkého patra • hyperkapnie, polycytemie, hypertrofie pravé komory, cyanózou a denní nespavost • dýchací problémy - vmetek do plicních cév
některé nádory	dělohy, prsu, prostaty, kolorektální, žlučnickový
zažívací obtíže	gastroezofageální reflex (pálení žáhy), kýly, žlučové kameny, záněty žlučníku či jaterní steatóza (tučnění jater)
pohlavní potíže	<ul style="list-style-type: none"> • mužská impotence • hirsutismus - nadměrné ochlupení • poruchy menstruace - necyklický nadbytek estrogenů produkovaných tukovou tkání (enzym aromatáza mění androgeny na estrogeny) • neplodnost • defekty plodu u obézních matek

(Perušičová, 2007; Nečas a kol., 2006; Hainer a kol., 2004)

kardiovaskulární onemocnění	<ul style="list-style-type: none"> • arteriální hypertenze • chronická ischemická choroba srdce • ateroskleróza mozkových cév • varixy dolních končetin • tromboembolické onemocnění
ortopedické poruchy	degenerativní postižení nosných kloubů a páteře
kožní problémy	plísňové onemocnění, zapárka v místech tukových záhybů, strie, celulitida, otoky, horší hojení ran, intertrigo- zánět kůže pod převislými místy

1.2.3.2. Typ hruška - neboli ženský typ obezity

U těchto žen dochází ke zmnožení podkožního tuku na hýždích a stehnech. Tento typ obezity nebývá provázen tak častým výskytem zdravotních komplikací, ale o to hůře se nám s nadměrnými partiemi bojuje. Samozřejmě v případě, že má někdo hodnotu BMI kolem 35 a výše, je v každém případě obrovské riziko vzniku cukrovky v pozdějším životě. Ženský, odborně **gynoidní** typ obezity, je dán především genetickou dispozicí. Zapřičiňuje ji zvýšená citlivost tkání v oblasti stehen a hýždí na hormonální vlivy, které vysílají signál tkáním, ať si tuk do těchto partií ve zvýšené míře ukládají.

Pro jednoduchou klasifikaci androidního typu byl řadu let používán poměr obvodu pasu a boků (waist to hip ratio - **WHR**), kde hranicí je u mužů poměr nad 1.0 a u žen nad 0.85. Je-li WHR nižší, mluvíme naopak o gynoidním typu obezity. Dnes se častěji užívá přesné měření rizikového tuku uloženého v břiše, mezi orgány a na břiše v podkoží (např. počítačovou tomografií). Někdy se uvádí i tzv. difúzní samotyp obezity, a ten má tukovou vrstvu rozloženou po celém těle (*Marieb, 2006, Svačina, 2003; Rybka, 2007*).

1.3. Asociační studie

1.3.1. Polymorfismus

Polymorfismus je genetická varianta vyskytující se minimálně u 1% populace. Tzn. nejedná se o spontánní mutace, které se vyskytly a rozšířily přes potomky v rámci jedné rodiny. Jestliže je frekvence alely menší, hovoříme o vzácné alele.

DNA-polymorfismem nazýváme stav, kdy se dvě alely liší ve své nukleotidové sekvenci. Polymorfní lokusy se v populaci vyskytují nejméně ve dvou alelách. Některé mají fenotypové projevy, ale všechny jsou variace na úrovni DNA, v genotypu.

Polymorfizmy umožňují: typizaci tkání, a tak najít co nejlepší shodu mezi dárcem orgánů a příjemcem; hledání genů způsobujících různá onemocnění, kdy vazba může být využita v DNA diagnostice nebo v populačních studiích.

Důležitý je přitom proteinový produkt alel, který může být identifikován:

serologií - využívající protilátky pro detekci různých forem proteinu

elektroforézou - jestliže se změní aminokyseliny v proteinu, mění se zároveň jejich elektrický náboj, načež migrují více nebo méně v elektrickém poli.

Variety enzymů se liší nepatrně sekvencí aminokyselin, takže odlišně migrují pod elektroforézou. S použitím ošetřujícího gelu obsahujícího substrát pro enzym může být jeho přítomnost vizualizována.

Další možností je sledování polymorfismů DNA. K analýze DNA slouží tzv. řetězová polymerázová reakce s následnou analýzou buď na agarózovém a polyakrylamidovém gelu, nebo pomocí dalších metod (RealTime PCR, čipové technologie atd.).

Můžeme sledovat celou řadu různých polymorfismů, jako: monogenně podmíněné fenotypové znaky, krevní skupiny, sérové proteiny, HLA antigeny, tandemové repetice - (minisatelity, mikrosatelity), jednonukleotidové polymorfizmy atd.

V této studii se zabýváme tzv. SNP (jednonukleotidový polymorfismus - *single nucleotide polymorphism*). To znamená polymorfismus pouze v jednom nukleotidu, jenž může být nahrazen jakýmkoliv jiným nukleotidem, což může způsobit změnu struktury proteinu, změnou v příslušném

kodónu (kódující struktura je sestavena ze tří nukleotidů, které mohou kódovat pouze jednu aminokyselinu). Většina SNP leží mimo kódující sekvence. Ty, které leží uvnitř exonů, jsou převážně bez vlivu na aminokyseliny, díky degeneraci genetického kódu.

Nevýhoda SNP je omezené množství alel v populaci. Je tedy třeba více SNP k získání té samé informace jako poskytuje jeden mikrosatelit, ale paralelní zpracování SNP je daleko snazší. Část variability může být funkční - SNP v kódujících sekvencích, které vedou ke změně aminokyseliny, a SNP v regulačních sekvencích (RCN, 2007; Sykes, 1999).

1.3.2. PCR

PCR (Polymerase chain reaction) je metoda umožňující zvýšit mnohokrát množství zvoleného úseku DNA bez nutnosti klonovat DNA v živých organizmech.

DNA vlákna jsou denaturována zahřátím na teplotu přibližně 94°C, načež přidáme určité množství krátkých oligonukleotidových primerů. Ochlazením se primery komplementárně naváží na volné řetězce DNA, v místech ohraničujících zvolenou sekvenci. Mají tak stejný význam jako RNA primery při normální replikaci. V momentě, kdy se naváží, opět zvýšíme teplotu, abychom optimalizovali aktivitu tzv. *Taq* polymerázy (DNA polymeráza), která funguje při vysokých teplotách a spouští syntézu nové DNA od 3' konce primeru. Dvě nová vlákna rostou ve směru 5'→3'. Syntézou končí první kolo zdvojení zkoumaného segmentu DNA, na jehož konci získáváme dvě zdvojené molekuly DNA. Celou proceduru opakujeme stále stejným způsobem, čímž získáváme pokaždé dvojnásobek výchozího počtu molekul. Není zapotřebí přidávat další molekuly primerů, jelikož na počátku bylo použito velké množství. Primery mají délku obvykle zhruba 18 až 30 bází.

Počet repetice na každém jednotlivém vlákně se může velmi lišit v rámci, v rozsahu od 4 do 40 opakování (**Obr. 2**). Opakující se nukleotidy tohoto typu jsou označovány – jako hypervariabilní mikrosatelity neboli VNTR (variable number of tandem repeat) sekvence. Od každého rodiče se většinou dědí alela s odlišným počtem VNTR. S použitím PCR amplifikace, je možno přesně stanovit příslušný genotyp a lze pak pozorovat, jak se jeho vliv odráží na odlišných fenotypech u různých pacientů.

Obr. 2: Užití PCR k detekci polymorfizmů

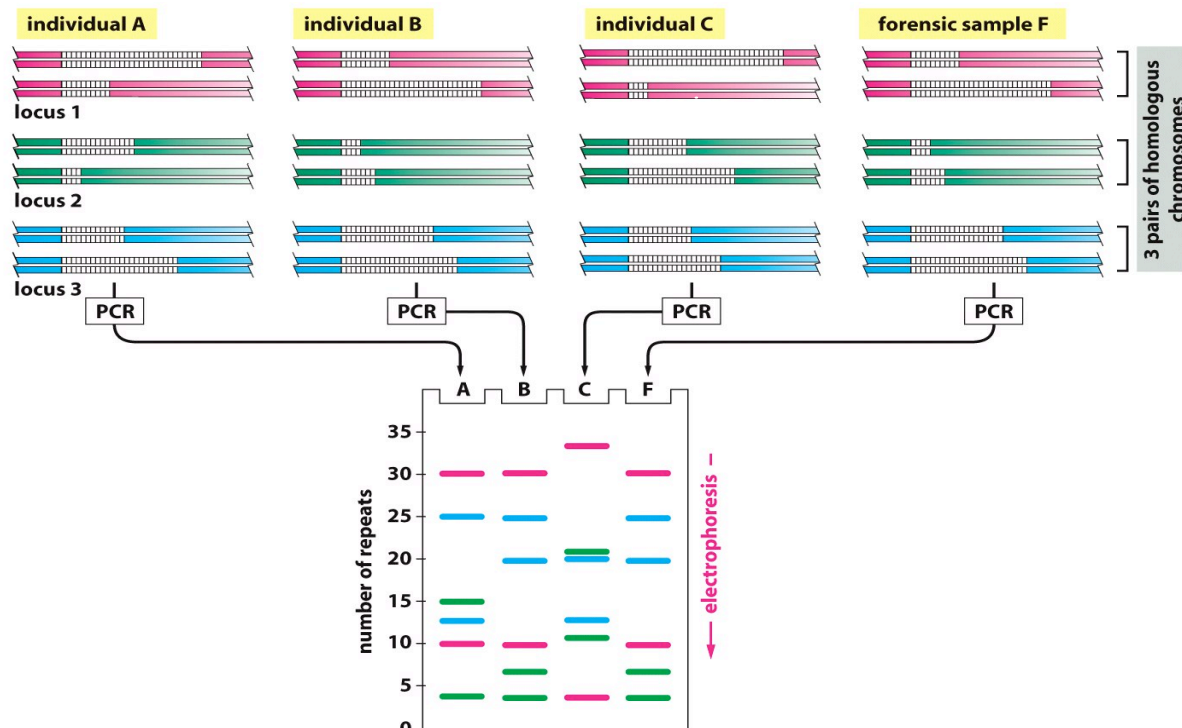


Figure 8-47b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

(Bruce Alberts, 2008; Cambell, 2006)

1.3.3. Asociační studie

Nejjednodušší způsob, jak zjistit potenciální vliv polymorfizmu nějakého genu na komplexní polygenní formy obezity, je asociační analýza. Ta studuje známé geny, či geny s předvídatelnou biologickou funkcí, vytypované vazebnou analýzou a pozičním klonováním nebo na základě výsledků studií zvířecích modelů, u nichž se předpokládá, že by se mohly podílet na patogenezi onemocnění. Pro lidskou obezitu je navrženo více než 250 takových kandidátních genů, z nichž řada byla pečlivě studována.

Takový "funkční" kandidát je pak podroben detailní genetické a molekulárně biologické analýze a jsou testovány hypotézy o asociaci specifických polymorfizmů daného genu se zkoumaným znakem nebo některým z tzv. přechodných fenotypů.

Následuje design studie. Zde si volíme diagnostická kritéria a vybereme si polymorfizmy genů vybraných ke genotypizaci (nejlépe funkčních polymorfizmů, které ovlivňují např. expresi genu). Důležitou složkou ze statistického hlediska je počet osob ve studii. Platí pravidlo, že čím větší počet polymorfizmů zkoumáme, tím větší musí být počet zkoumaných osob. Chybou studií polygenních onemocnění je, že bývá zkoumán vztah pouze jednoho polymorfizmu k dané nemoci. Většinou mají asociační studie charakter "case-control" (případ-kontrola), kdy je porovnáváno relativní zastoupení určitého polymorfizmu mezi skupinami, z nichž jedna dané onemocnění vykazuje, zatímco druhá nikoli.

Zachováváme zásady správného výběru dvou nebo více skupin osob, které jsou po diagnostické stránce shodné. Provedeme genotypizace jednotlivých zkoumaných osob. Pro každou zkoumanou skupinu osob jsou zvlášť vypočítány genotypové a alelické frekvence, které se pak statisticky srovnávají, přičemž se odfiltrují falešně pozitivní výsledky. Testuje se nulová hypotéza, že srovnávané soubory se neliší. Pokud statistická významnost (p) je menší než 0.05, mluvíme o signifikantním rozdílu.

Nalezeme-li tak asociaci mezi zkoumanou genetickou variantou a onemocněním, lze vyslovit předpoklad, že tato alela nějakým způsobem s onemocněním souvisí, nebo je ve vazebné nerovnováze se skutečnou kauzální alelou, tzn., že leží velmi blízko (je jejím markerem).

Do oblasti asociační analýzy pronikají stále nové metody - např. použití čipů umožňujících současně testování desítek až stovek tisíc jednonukleotidových polymorfizmů (SNP), díky čemuž se stává realizovatelnou dokonce celogenomová asociační analýza, i když s množstvím testovaných polymorfizmů prudce narůstá riziko falešně pozitivních pozorování, a je třeba dávat velký pozor při interpretaci výsledků těchto studií.

Nová generace kandidátních genů bude jistě vytipována na základě výsledků expresních studií (expresní profil např. tukové tkáně či hypotalamu či funkční expresní profil regulovaný příjmem potravy, fyzickou aktivitou, farmaky). Také vazebné studie, vycházející výlučně z identifikace oblasti genomu (lokusu), který významně ovlivňuje variabilitu zkoumaného znaku spolu s pozičním klonováním a studií vazebné nerovnováhy, lokalizují "horká místa", která budou moci být díky osekvenování lidského genomu dešifrována, a tak bude indentifikována řada doposud neznámých kandidátních genů (Šerý, 2002; Hainer a kol., 2004).

1.4. BETA-2-ADRENERGNÍ RECEPTOR

Kobilka a kol., (1987) lokalizoval gen v 5q31-q32. To je stejná pozice jako pro gen kódující platelet-derived growth factor receptor a je přiléhající k místu FMS onkogenu, receptoru pro CSF1. Pomocí in situ hybridizace, Yang-Feng a kol. (1990) lokalizoval přiřazení k 5q32-q34.

Regulací energetického výdeje hrají **katecholaminy** (hormony, deriváty katecholu; adrenalin, noradrenalin a dopamin, vznikající v nadledvinách i v CNS, kde působí jako přenašeči nervového vzruchu) důležitou roli v metabolismu lipidů za pomoci čtyř skupin adrenergních receptorů ($\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 3$). Katecholaminy aktivované β -Adrenergní receptory stimulují, zatímco $\alpha 2$ -adrenergní receptor inhibuje lipolýzu v tukové tkáni (podle Lafontan a kol., 2000). Geny kódující tyto receptory by mohly představovat zajímavé kandidáty k vysvětlení části jejich genetické predispozice k lidské obezitě. **$\beta 2$ -adrenergní receptor (ADRB2)** je zapojen v lipidové mobilizaci jako hlavní lipolytický receptor v lidských tukových buňkách, a proto genetické variace v tomto receptorovém genu by teoreticky mohly snížit lipolýzu a náchylnost k obezitě.

Z celkových devíti detekovaných bodových mutací v tomto genu u normálních jedinců a astmatiků (Podle Reihnsaus a kol., 1993) jsou pouze čtyři zapříčiňující změny v kódovaných aminokyselinách na zbytcích 16, 27, 34 a 164). Nejfrekventovanější jednonukleotidové polymorfizmy se vyskytují na kodonu 16 (rs1042713; B16) a kodonu 27 (rs1042714; B27) jejichž variace údajně mění ADRB2 funkci tím, že modifikuje aminokyselinovou sekvenci na extracelulárním N-konci ADRB2. Glu27 alela má údajně limitovat regulaci ADRB2, a tím pádem měnit BMI. Byly již nalezeno několik souvislostí tohoto polymorfizmu s řadou onemocnění jako diabetes, astma, částečná hypertenze či obezita.

Již existuje řada studií testující asociaci mezi Arg16Gly a Gln27Glu polymorfizmy a obezitou. Ze 23 studovaných populací v 15ti z nich byl Glu27Gln polymorfizmus označen jako rizikový faktor, ovšem jen u Japonců (Ishiyama-Shigemoto a kol., 1999) a Švédů (Large a kol., 1997) šlo o signifikantní faktor. Nejvyšší hodnota OR byla 3.4 u Mori a kol., 2001. V 8 studiích měl polymorfizmus ochranný efekt, ale ten byl signifikantní jen u Francouzů (Meirhaeghe a kol., 2000) s OR=0.566 a CI=95%, 0.381-0.839. Celková frekvence Glu27 alely je globálně odhadovaná na 30.3%, ale procento se hodně liší od jedné populace ke druhé populaci (**Tabulka č. 5**). U bělochů od 44.74% /Poláci/ po 78.29% /Nizozemci/ - průměr 40.7%; u zbývajících ras od 39.16% po 63.89%, a lišila se od 6.71% u Ayamara amerických indiánů po 20.51% u Korejců s průměrem 7% pro skupiny Asiátů, Pacifických vnitrozemců a amerických indiánů.

Účelem meta-analýzy *Jalba, M.S. a kol., 2008* je nalezení asociace mezi Glu27Gln a Arg16Gly polymorfizmy beta2-adrenergní receptor (ADRB2) genu a obezitou. Byli zařazeni obézní i neobézní jedinci. Počáteční selekce obsahovala 14 444 subjektů B27 a 6 825 B16. Po testování každé kontrolní skupiny pro Hardy-Weinbergovu rovnici výsledná selekce obsahovala 10 404 a 4 328 jedinců. Studie byly publikovány před 18. srpnem 2006. Frekvence Glu27 alelových nositelů, homozygotních

i heterozygotních, měla rozsah od 6.71% u Aymara Americans až po 78.29% u Nizozemské populace. Frekvence Arg16 alelových nositelů sahá od 51.4 po 64.6% v Evropské populaci od 71.1 po 85.6% ve východní Asii. Celkové OR z celé analýzy neukazuje žádnou asociaci mezi buď rs1042714 nebo rs1042713 a obezitou. V rasových skupinách s nízkou Glu27 frekvencí (Asiatů, Pacifických ostrovanů a amerických Indiánů), OR=1.566 odhalilo signifikantní riziko vzniku obezity v případě rs1042714. Výsledky nebyly nalezeny ve východní Asii pro rs1042713. Přítomnost Glu27 alely v ADRB2 genu se jeví jako zásadní rizikový faktor pro obezitu u Asiatů, Pacifických ostrovanů a amerických Indiánů, ale ne u Evropanů. Obezita zřejmě není spojena s Arg16 alelou. Následující odstavce obsahují stručné výsledky vybraných publikovaných článků.

Tabulka č. 5: Frekvence glu27 alely v prostudovaných populacích (Podle Jalba, MS a kol. 2008)

Study's first author	Total number of patients	Gender (males/females)	Ethnicity	BMI cutpoint	Percentage of patients carrying the variant Glu27 allele ^a
Ishiyama-Shigemoto <i>et al.</i> (4)	508	344/164	Japanese	27	15.94
Hayakawa <i>et al.</i> (5)	210	210/0	Japanese	30	10.48
Large <i>et al.</i> (6)	140	0/140	Swedish	27	57.86
Lin <i>et al.</i> (7)	211	Gender not identified	Anglo-Celtic Australian white	25	63.03
Ehrenborg <i>et al.</i> (8)	180	180/0	Swedish	30	61.67
Echwald <i>et al.</i> (9)	205	205/0	Danish	27	64.88
Oberkofler <i>et al.</i> (10)	399	0/399	Austrian German	30	59.15
Mori <i>et al.</i> (11)	278	278/0	Japanese	26.4	10.43
Hellstrom <i>et al.</i> (12)	247	138/109	Swedish	27	63.97
Lange <i>et al.</i> (13)	1093	473/620	US African Americans and Hispanics	30	39.16
Gonzalez Sanchez <i>et al.</i> (14)	666	319/347	Spanish	30	61.06
Meirhaeghe <i>et al.</i> (16)	836	419/417	French	30	66.87
Tafel <i>et al.</i> (18)	430	Gender not identified	German	Extreme vs. underweight	62.56
Kortner <i>et al.</i> (19)	442	184/258	German	Extreme	65.84
Martinez <i>et al.</i> (20)	313	61/252	Spanish	30	61.98
Malczewska-Malec <i>et al.</i> (21)	38	38/0	Polish	30	44.74
Garenc <i>et al.</i> (32)	774	332/442	United States and Canada, both whites and African Americans	30	56.85
Kim <i>et al.</i> (29)	195	101/94	Korean	27	20.51
Carlsson <i>et al.</i> (22)	1487	715/772	Swedish	30	67.85
Iwamoto <i>et al.</i> (26)	251	251/0	Japanese	25	19.52
Kato <i>et al.</i> (27)	1450	788/662	Japanese	26	12.69
Galletti <i>et al.</i> (23)	993	993/0	Italian	30	49.55
Santos <i>et al.</i> (31)	149	56/93	Aymara American Indians	30	6.71
van Tilburg <i>et al.</i> (24)	502	231/271	Dutch	30	78.29
Bengtsson <i>et al.</i> (25)	678	292/386	Swedish	30	69.91
Duarte <i>et al.</i> (30)	1020	432/588	Tongans	30	9.71
Phares <i>et al.</i> (33)	72	30/42	United States, mixed races	30	63.89
Chang <i>et al.</i> (28)	683	Gender not identified	Chinese	30	15.96

^aIncludes both homozygous and heterozygous patients.

1.4.1. Studie s pozitivní asociací

Ishiyama-Shigemoto S a kol. (1999) analyzoval Arg16Gly, Gln27Glu, a Thr164Ile polymorfizmy a jejich vliv u **japonských neobézních jedinců** (BMI < 27 kg/m²) a 108 obézních jedinců. Gln27Glu záměna byla dvakrát tak častá u obézních než u neobézních (0.14 vs 0.07, p = 0.001, odds ratio 2.14, 95% CI 1.35±3.41). Frekvence Glu27 alely byla také vyšší u pacientů s 2. typem (non-insulin-dependent) diabetes melitus než u zdravých nediabetiků (0.14 vs 0.07, p = 0.001, odds ratio 2.13, 95% CI 1.34±3.41). Obézní nositelé alelické varianty měli vyšší koncentraci serum triglyceridu než obézní homozygoti pro standartní alelu. Naopak frekvence Gly16 homozygotů byla nižší v obézních ženách v porovnání s neobézními (11% vs 28%, p = 0.01, odds ratio 0.30, 95% CI 0.12±0.75), ovšem asociace nebyla zjištěna u mužů. Thr164Ile záměna nebyla detekována u žádného jedince této studie. Tento výzkum předpokládá, že amino-terminal polymorfismus b2-adrenergního receptorového genu, by mohl ovlivňovat molekulární patogenezi obezity, hypertriglyceridemie, a proto rozvoj diabetes melitus 2. typu.

Søren M. Echwald a kol. (1998) Žádnou asociaci mezi **dánskými muži** homozygotními v Glu27 a obezitou, ať už porovnáním obézních s kontrolními jedinci (P > 0.91) nebo srovnáním obézních s nejbližšími kontrolními jedinci (P > 0.95).

Mori Y a kol. (1999) zjistili, že Gln27Glu ADRB2 varianta má zásadní vliv na obezitu a distribuci tuku u **japonských mužů** a přišli na 249 standartních Gln27 homozygotů a 28 Gln27/Glu27 heterozygotů, a jednoho mutantního Glu 27 homozygota. Frekvence mutantní Glu 27 alely byla značně vyšší u obézních jedinců než u neobézních nebo středních jedinců (0.11 vs 0.04, P= 0.004). Zjistilo se, že u japonských mužů je Gln27Glu β2AR varianta asociovaná s obezitou díky podkožní tukové akumulaci.

B Kortner a kol. (1999) studoval **německé pacienty** s chorobnou obezitou (BMI 51.6 a více) a 199 zdravých dárců krve. Stejná frekvence 0.42 glu alely byla přítomna v obou skupinách. Ani incidence u obézních žen (0.41, n=197) ve srovnání s kontrolními ženami (0.43, n=61), ani ta u obézních mužů (0.44, n=46) v porovnání s kontrolními muži (0.41, n=138) nebyla výrazně odlišná. Odlišnost ve frekvenci mezi obézními muži a ženami, 0.44 vs 0.41 nebyla signifikantní (P=0.68). Genotypová informace z rodin 18 obézních pacientů neukázala žádnou asociaci mezi glu27 alelou a BMI, tím pádem žádný vliv na rozvoj chorobné obezity.

Martinez JA a kol. (2003) vykonal ve **Španělsku** case-control studii, aby zjistil případný efekt Gln27Glu polymorfizmu v ADRB2 genu na riziko vzniku obezity závisící na potravinovém příjmu u lidí s BMI > 30 kg/m² a kontrol BMI < 25 kg/m². Alelická frekvence pro Glu27 polymorfizmus získaná přes PCR–RFLP metodologií, byla 0.40 v případě obézních a 0.37 u kontrol, což je podobné jako u bělošské populace. Potravinový příjem byl ustanoven použitím dříve validovaných food frequency questionnaire. Incidence obezity nebyla přímo ovlivněna polymorfizmem (OR = 1.40; P = 0.246). Avšak signifikantní interakce mezi příjmem uhlovlodíku a přítomností Glu27 varianty pro pravděpodobnost obezity byla zřejmá. Ženy s polymorfizmem a vyšším uhlovlodíkovým příjmem (>49% energy) vykazovaly vyšší riziko pro vznik obezity (OR = 2.56, P = 0.051). Navíc vysoký příjem CHO (E > 49%) byl asociován s vyšší úrovní inzulinu mezi nositelkami Gln27Glu polymorfizmu (P < 0.01). Tato gen-nutrientní interakce zdůrazňuje důležitost poznávání výsledku některých leptogenních mutací v závislosti na životním stylu a může vysvětlit heterogenitu výsledků předchozích studií.

Gonzalez Sanchez a kol. (2003) se zabýval 666 dospělými nepříbuznými **Španěly**. ADRB2 Gln27Glu genotypy byly určeny PCR–RFLP. Glu27 homozygotní obézní muži měli značně vyšší BMI a značně delší předozádový průměr než heterozygoti a Gln27 homozygoti. U žen žádný rozdíl v antropometrických a biochemických měřeních zjištěn nebyl. Analýza ukázala, že Glu27 homozygoti po adjustaci předozadního průměru těla na břichu jsou spojeni s diabetes melitus 2. typu. Z toho vyplývá, že Glu27Gln polymorfizmus ADRB2 genu může být rizikovým faktorem obezity pouze u mužů pro akumulaci viscerálního tuku a pro rozvoje diabetu 2. typu.

Lin RCY a kol. (2001) vykonal asociační studii ve skupině s normálním a vysokým krevním tlakem. **Anglo-keltští australští běloši**, jejichž rodiče měli stejný krevní tlak. Glu27 frekvence byla 0.41 u osob s vysokým krevním tlakem a 0.42 u zbytku ($P = .82$). Ve skupince s vyšším krevním tlakem byla Glu27 alela přítomna v 61 jedincích s nadváhou ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) v porovnání 41 hubenými (0.49 vs 0.31, $P = .012$). Dokonce, Glu27 byl spojen s vyšším BMI u těchto jedinců: 24 +/- 4 kg/m^2 , 27 +/- 5 kg/m^2 , a 28 +/- 5 kg/m^2 pro Gln/Gln, Gln/Glu, a Glu/Glu, ($P = .0058$). Jak vidno, polymorfismus Gln27Glu ADRB2 genu chybí u lidí s vysokým krevním tlakem, ale může ovlivňovat tělesnou hmotnost.

Lange a kol. (2005) rekrutoval rodiny **afrických a hispánských Američanů**. Zjišťoval distribuci adipózní tkáně pomocí počítačové tomografie. Z 992 jedinců genotypizovaných pro tyto polymorfizmy: 57% byly ženy a 15% bylo diagnostikováno pro diabetes 2. typu. Glu27 alela Gln27Glu polymorfizmu byla pozitivně asociována s BMI ($p=0.025$), viscerální adipózní tkání ($p<0.0001$) a poměrem viscerální/podkožní ($p=0.009$), ale ne s podkožní tukovou tkání ($p=0.952$). Arg16Gly polymorfismus se nevztahoval k žádným měřením tloušťky. Genetické variace v ADRB2 genu proto může ovlivňovat ukládání (viscerálního) tuku a velikost těla u obou etnik.

E Ehrenborg a kol. (2000) sesbíral vzorky od 180 zdravých **Švédských** mužů. Jedinci s E27 alelou a/nebo G16 alelou měli signifikantně vyšší BMI a ještě k tomu jedinci s E27 alelou měli signifikantně vyšší koncentraci cholesterolu v plazmě, triglyceridů atd., než homozygoti pro Q alelu. E27 alela ADRB2 genu proto pozitivně ovlivňuje mírně zvýšené BMI a dyslipoproteinemii u švédských mužů.

1.4.2. Studie s částečnou asociací

Large a kol. (1997) zkoumali vztah s obezitou u **Švédek**. Objevili, že variace gln27 na glu je opravdu prokazatelně asociována s obezitou s relativním rizikem obezity přibližně u 7 jedinců z 10. Hmozygoti pro glu27 měli v průměru 20 kg nadbytek tuku a asi o 50% větší tukové buňky než kontroly. Avšak nebyla prokázána žádná asociace se změnami ve funkci ADRB2. Polymorfismus arg16gly na druhou stranu byl spojen s pozměněnou funkcí ADRB2. Gly16 nebyl s obezitou asociován. Předpokládají tak, že genetické variace v ADRB2 genu by mohly mít zásadní vliv na obezitu, energetický výdej a lipolytickou funkci ADRB2 v adipózních tkáních, přinejmenším u žen.

Garenc C a kol. (2003) zjišťovali asociaci obou polymorfizmů s tělesným tukem, distribucí tuku měřenou před a v odpovědi na 20-týdenní vytrvalostní tréninkový program u obézních **Američanů, Kanadčanů bílých a černých** účastníků rodinné studie dědičnosti (USA, Kanada). Interakce gen-obezita byla nalezena u bílých pro několik adipózních fenotypů před cvičením. Analýzy provedené zvlášť u obézních a neobézních odhalily, že nositelé *Glu27* alely mají nižší akumulaci tuku (BMI, FAT, a %FAT) než nenositelé. Mezi bílými obézními ženami, Gly16Gly homozygoti měli nižší akumulaci tuku (BMI, FAT, a SF8) než Arg16Gly a Arg16Arg. V odpovědi na cvičení bílé ženy s Arg16Arg genotypem vykazovaly vyšší redukci BMI, FAT a %FAT. Výsledky získané u černých byly vesměs negativní. Polymorfizmy zde ovlivňují množství tělesného tuku u bílých obézních mužů (Gln27Glu) a žen (Arg16Gly), stejně tak změny v adipozitě v odpovědi na vytrvalostní cvičení u bílých žen (Arg16Gly).

Phares DA a kol. (2004) chtěli zjistit podíl polymorfizmů ADRB2 genu a jejich Gen-gen interakcí na variabilitě tréninkem indukované odpovědi tělesného tuku u **Američanů (všechny rasy)**. Použitý soubor byl tvořen 70 zdravými - sedavými muži ($n=29$) a ženami po přechodu ve věku od 50 do 75 let, s $BMI \leq 37 \text{ kg/m}^2$, z Washingtonu, DC, metropolitní oblasti. Absolvovali 6týdenní stabilizaci potravy (American Heart Association diet) před 24 týdny aerobického tréninku pod dohledem. Potrava byla udržovaná přes intervention. Byla měřena změna v procentu celkového tělesného tuku, procentu hlavního tuku a tukové množství přes DXA v ADR genotypových skupinách (Glu12/Glu9 alpha2b-ADR, Trp64Arg ADRB2, a Gln27Glu ADRB2) na začátku a po 24 týdnech aerobiku. Byla zde tendence odpovědi tukového množství ($p = 0.03$). Kombinované genetické vlivy vysvětlily 17.5% celkové variability modelu pro procento celkového tělesného tuku, 22% pro procento hlavního tuku a 10% pro

množství tuku. Odpověď tělesného tuku na cvičení u starších dospěláků je asociováno s kombinovaným efektem Glu12/Glu9 alpha2b-, Trp64Arg beta3-, a Gln27Glu beta2-ADR genové varianty a jejich gen-gen interakcí.

Bengtsson K a kol. (2001) si zvolili za cíl zjistit, zdali existuje souvislost mezi Arg19Cys, Arg16Gly, Gln27Glu polymorfizmy ADRB2 genu s hypertenzí. Asociační studie zahrnovala 291 pacientů s hypertenzí bez diabetu 2. typu, 124 s hypertenzí a diabetem a 265 zdravých kontrol ze **Švédska**. Navíc byli zahrnuti sourozenci s normálním tlakem, kteří byli v rozporu v Arg16Gly (72 párů) a Gln27Glu (40 párů) polymorfizmu a pocházeli z rodin s diabetem 2. typu z Finska. Genotypizace proběhla přes PCR-RFLP analýzu. Homozygotní nositelé Arg16 alely měli signifikantně vyšší OR pro hypertenzi v pacientech s diabetem 2. typu (OR 2.14; 95% confidence interval [CI], 1.05-4.33), obzvláště mezi hubenými (BMI < 27 kg/m²) pacienty (OR 3.47; 95% CI, 1.06-11.33). Gln27 alela ukázala slabší vztah s hypertenzí (OR 1.55; 95% CI, 1.00-2.41) a byla též ve vazebné nerovnováze s Cys19 alelou 5'LC-Arg19Cys polymorfizmu. Sourozenci s přinejmenším jednou kopií Arg16 alely měli vyšší systolický tlak krve (P=0.049), a příbuzní nediabetici měli vyšší BMI (P=0.026) než příbuzní homozygotní pro Gly16 alelu. Tým potvrdil, že Arg16 alela ADRB2 genu zvyšuje riziko hypertenze u jedinců s diabetem 2. typu a je spojena i s vyšším tlakem krve a BMI u sourozenců, které nejsou ve shodě pro tento polymorfizmus.

Carlsson a kol. (2001) zkoumali **Švédy** s různým stupněm glukózové tolerance. ADRB2 Gln27 alela se vyskytovala častěji u 219 jedinců s diabetem 2. typu, než u 237 zdravých jedinců (59.8 % vs 52.3 %; OR = 1.72, p = 0.02), přičemž neexistuje žádná významná odlišnost ve frekvenci ADRB3 Arg64 alely. Jedinci homozygotní pro alely Glu27 a Trp64 měli ovšem nižší převahu výskytu diabetu, než s jinou genotypovou kombinací (OR = 0.58, p = 0.03). Hlavní varianty v ADRB2 a ADRB3 genech jsou spojeny se zvýšením hladiny "postního inzulínu" a NEFA koncentracemi a mohou zvyšovat citlivost na diabetes 2. typu.

Noriyuki Iwamoto a kol. (2001) se zaměřili na roli polymorfizmů na kodonech 16 a 27 ADRB2 genu v rozvoji tučných jater. Jeho soubor byl tvořen z 251 nepřibuzných zdravých **japonských mužů** nezávislých na drogách ani alkoholu. Alelická frekvence ADRB2 genové mutace se nelišila mezi obézními (BMI > 25.0 kg/m²) a neobézními (BMI ≤ 25.0 kg/m², n=100). Gly16 homozygoti měli nižší (HDL-C) než Arg16 homozygoti (1.50±0.4 vs. 1.32±0.3 mmol/l, p=0.014). Ovšem nebyl žádný vztah mezi tučnými játry a frekvencí Gly16 alely. Gln27Glu27 heterozygoti měli vyšší koncentrace sérových triglyceridů, než Gln27Gln27 homozygoti (1.62±0.93 vs. 2.21±1.67 mmol/l, p=0.013). Analýza značí, že heterozygoti Gln27Glu měli silně vyšší výskyt tučných jater než ti bez mutace (Glu27 alelická frekvence 0.07 vs. 0.12, p=0.047; OR=1.92; CI=95%, 1.01–3.68). Konečné výsledky napovídají, že v genu ADRB2 je Glu27Gln polymorfizmus spojen s hypertriglyceridemií a nezávislostí na obezitě, proto může být zapojen v molekulární patogenezi tučných jater.

Tien-Jyun Chang a kol. (2002) prostudovali 130 čínských pacientů s diabetes melitus 2. typu a 130 kontrol odpovídajících v pohlaví věku a BMI, s normální glukózovou tolerancí. Arg16Gly a Gln27Glu polymorfizmy ADRB2 genu byly určeny přes PCR-RFLP. Odlišnost v genotypových frekvencích Arg16Gly polymorfizmu byla zaznamenána mezi skupinami v pohlaví, věku a BMI mezi odpovídajícími case-control páry (P = 0.039). Arg16Gly polymorfizmus byl jediný nezávislý faktor pro rozvoj diabetu 2. typu (P = 0.021). Arg16Gly polymorfizmus byl nezávisle asociován s věkem počátku diabetu 2. typu (P = 0.017). Nebyl žádný rozdíl v Gln27Glu polymorfizmu mezi diabetiky a kontrolními skupinami. V **Thaiwanské populaci** homozygoti Arg16 ADRB2 genu projevovali vyšší frekvenci (OR 1.87, 95% CI 1.34–2.40) pro rozvoj diabetu 2. typu. Navíc byl tento polymorfizmus spojen s dřívějším počátkem 2. typu. Přitom Glu27Gln polymorfizmus neměl žádný vliv na ať už BMI nebo diabetes 2. typu.

1.4.3. Studie s negativní asociací

Hellstrom L a kol. (1999) studovali celkově nepříbuzné **švédské muže a ženy** BMI v rozsahu 19.4–53.4 kg/m². Obezita byla definována BMI nad hodnotu 27. Alelická frekvence Gln27 a Glu27 se neliší mezi muži a ženami v případě, kdy byli obézní a neobézní zkoumáni společně. Avšak u obézních mužů byla frekvence Glu27 alely značně menší (P= 0.034), zatímco frekvence této alely vzrostla u obézních žen (P=0.013). Žádný vliv androgenového stavu na distribuci Gln27Glu nemohl být u obézních žen demonstrován. Ve výsledku vidíme pozitivní asociaci mezi obezitou a Glu27 genetickou variantou ADRB2 u žen, u mužů je asociace negativní.

Oberkofler H a kol. (2000) analyzovali **ženy v Rakousku a Německu**. Frekvence Gln27 a Gly16 alel, stejně jako ADRB2 haplotypy, byly stejné u obézních a štíhlých jedinců. Mezi Gln27Glu nebo Gly16Arg polymorfizmy a plazmovým leptinem nebo expresí UCP-1 genu adipózní tkáň nebyla nalezena žádná asociace ani u jedné skupiny. Proto se u této populace nejedná o hlavní faktor podmiňující obezitu.

Meirhaeghe A a kol. (2000) sledovali vliv polymorfizmů Arg16Gly a Gln27Glu na velký vzorek **francouzské populace** (n=836, 419 mužů, 417 žen). Gln27Gln subjekty měli zvýšené riziko vzniku obezity (OR=1.77, 95% CI 1.19 ± 2.62, P=0.005). Tento efekt byl hlavně objeven u mužů (OR=2.40, 95% CI 1.34 ± 4.27, P=0.003). Muži s Gln27Gln genotypem vážili více, měli vyšší BMI, tělesnou váhu a WHR než ženy. Když ještě k tomu byli nositeli Arg16 alely, nárůst těchto hodnot byl ještě markantnější.

van Tilburgova JH a kol. (2003) studie zahrnovala nepříbuzné **Nizozemce** s diabetem 2. typu. Subjekty rozdělili do tří genotypových podskupin: 109 s Gln27Gln, 225 s Glu27Gln a 168 s Glu27Glu polymorfizmem. ANOVA věku v diagnóze 2. typu diabetu (61 ± 10, 60 ± 9, a 61 ± 9 roků pro Gln27Gln, Glu27Gln, a Glu27Glu genotypové skupiny), BMI (27.2 ± 3.8, 27.9 ± 4.4, a 28.2 ± 4.0 kg/m²), HbA_{1c} (7.2 ± 1.4, 7.4 ± 1.3, a 7.2 ± 1.2%; normální hodnoty <6.1%), plazmový cholesterol (5.3 ± 1.2, 5.3 ± 1.0, a 5.3 ± 1.0 mmol/l), plazmový HDL cholesterol (1.2 ± 0.3, 1.1 ± 0.3, a 1.2 ± 0.3 mmol/l), a plazmové triglyceridy (1.8 ± 1.1, 1.9 ± 0.9, a 1.9 ± 0.1 mmol/l) neukazují žádnou statisticky významnou odlišnost (všechny P > 0.26). Po vyloučení inzulin-ošetřených subjektů nebyly rovněž odlišnosti statisticky signifikantní (žádná odlišnost u žen ani u mužů zvlášť). Tím pádem alespoň v jejich skupině s diabetem 2. typu, Glu27Gln polymorfizmus ADRB2 nemá žádný zásadní efekt na BMI, věk v diagnóze diabetu, metabolickou kontrolu nebo koncentraci plazmových lipidů.

Santos JL a kol. (2002) sledovali vztah mezi Gln27Glu a Trp64Arg polymorfizmy ADRB2 a ADRB3 v mezimístní studii dospělých **Aymara** jedinců žijících v Andeanské oblasti severní Chile a obezitou. Alelická frekvence Glu27 alely ADRB2 genu byla 0.04 a alelická frekvence Arg64 varianty genu pro ADRB3 0.13. Nebyla nalezena žádná asociace mezi Trp64Arg polymorfizmem ADRB3 genu a BMI nebo dalšími kardiovaskulárními faktory. Malé množství jedinců s alelou kódující Gln27 v ADRB2 genu vážně limitovalo analýzu vztahu mezi genotypem a fenotypem s použitím tohoto polymorfizmu, přesto žádný jasný vztah nebyl zjištěn.

Tafel J a kol. (2004) studovali frekvence variant následujících polymorfizmů u **německých extrémně obézních dětí** a zdravých kontrol s podváhou: Gly/Ser v kodonu 49 a Arg/Gly v kodonu 389 ADRB1, Arg/Gly v kodonu 16 a Gln/Glu v kodonu 27 ADRB2, Trp/Arg v kodonu 64 ADRB3. Ser49 alela v ADRB1 genu frekvence byla 0.131 u obézních a 0.136 u hubených (p = 0.835), zatímco Gly389 alela v ADRB1 měla frekvenci 0.319 u obézních a 0.328 u hubených (p = 0.802). Gly16 v ADRB2 s frekvencí 0.590 u obézních a 0.611 u hubených (p = 0.591) a Glu27 alela v ADRB2 měla frekvenci 0.380 u obézních a 0.420 u hubených (p = 0.298). Nejistili tak signifikantní rozdíl pro alelu a nositele frekvencí individuálních polymorfizmů. Společně s dříve získanými daty genotypové distribuce ADRB3 varianty ve stejné studované skupině, žádný významný rozdíl mezi obézními a hubenými nebyl zjištěn pro distribuci v žádném ADR. Jejich data neukazují, že by tyto polymorfizmy ovlivňovaly časné počátky obezity.

Sung-Hoon Kim a kol. (2002) zjišťovali, zda polymorfizmy ADRB2 genu jsou spojeny s obezitou a diabetem u **Korejců**. Podle WHO kritéria pro ústní testování glukózové tolerance 57 jedinců mělo normální toleranci, 32 mělo oslabenou a 106 trpělo na diabetes melitus. Nediabetická skupina se skládala z 46 obézních (BMI >27 kg/m²) a 43 neobézních. Jedinci s diabetem byli v 64 případech obézní a 44 neobézní. Nebyl však žádný podstatný rozdíl mezi neobézními a obézními v alelické frekvenci polymorfizmu na kodonu 16 a 27 ADRB2 genu. Význačný rozdíl nebyl ani v případě BMI, FAT%, WHR, systolického a diastolického krevního tlaku a dalších typických znaků diabetu a obezity. Frekvence Glu27 homozygotů byla 1.1%. Tato zjištění ukazují, že variabilita v ADRB2 genu není hlavním determinantem rozvoje obezity a diabetu u Korejců.

Tetsuo Hayakawa a kol. (2000) zkoumali, zda se polymorfizmus Arg16Gly a Glu27Gln podílí na rozvoji obezity u 210 **japonských mužů**. Frekvence Gln27Glu a Arg16Gly polymorfizmů byly 0.05 a 0.48, a vztah s obezitou nalezen nebyl. Ukázala se silná vazebná nerovnováha mezi Gln27Glu a Arg16Gly polymorfizmy, avšak žádný zřejmý efekt na klinické nebo metabolické charakteristiky. Jejich výsledky proto nenalézají vztah mezi Gln27Glu a Arg16Gly polymorfizmy ADRB2 genu a obezitou u japonských mužů.

Duarte NA a kol. (2003) vytvořili náhodný soubor 1022 jedinců z **Tonga** a ty genotypizovali pro Glu27Gln polymorfizmus v ADRB2 genu. 84% tonganských mužů a 93% žen mělo nadváhu nebo obezitu (BMI ≥ 25 kg/m²) a 15.1% mělo diabetes 2. typu. Genotypové frekvence byly následující: Gln/Gln 90.3%, Gln/Glu 9.6% a pouze jeden Glu/Glu homozygot. Průměrné BMI mužů nebylo signifikantně odlišné od těch, co byli homozygotní (30.2±5.4 kg/m²) nebo heterozygotní (30.1±5.5 kg/m²) pro Gln alelu; stejně tak u homozygotních žen (33.7±6.2 kg/m²) a 34.0±5.6 kg/m² u heterozygotních. Glu alela nebyla asociována s dalšími měřenými znaky obezity nebo abnormálním glukózovým metabolismem v této převážně obézní populaci. Zjistili tak unikátní frekvenci Gln/Glu ADRB2 polymorfizmu v populaci, avšak žádný vztah.

Norihiro Kato a kol. (2001) se zabývali 842 **Japonci** s vysokým krevním tlakem a 633 s normálním. Ačkoliv nebyla objevena žádná signifikantní asociace pro Arg16Gly a T-47C, dvě statistické metody indikovaly kritickou asociaci ($P=0.01-0.04$) mezi Glu27 variantou a nižším krevním tlakem. U stanovené tendence k nízkému tlaku krve OR pro Glu27 vs Gln27 alelické frekvence byl roven 0.74 (95% CI, 0.55 to 0.99), což odráží nízkou frekvenci Glu27 alely (6%-8%) u Japonců. Neobjevil se žádný zjevný matoucí vliv na obezitu a diabetes na stanoveném vztahu. Předpokládá tak, že testované ADRB2 polymorfizmy se pravděpodobně nepodílí nijak podstatně na hypertenzi v japonské populaci.

Malczewska-Malec M a kol. (2003) si vzali za cíl zanalyzovat 122 osob z 40 obézních rodin. Zjistili 39% Glu27 a 8% Arg64 alelické frekvence. Výsledkem je, že v ADRB2 je Glu27 a v ADRB3 Arg64 alely měly protektivní efekt vůči metabolickým poruchám v obézních rodinách **severního Polska**.

Galletti F a kol. (2004) analyzovali 993 **italských mužů** středního věku pro Arg16Gly a Glu27Glu polymorfizmy ADRB2 genu. Frekvence pro kodon 27 byly: GlnGln = 50%; GlnGlu = 39%; GluGlu = 11%. Oba polymorfizmy byly ve vazebné nerovnováze. Rozdíl v BMI ani krevním tlaku v závislosti na genotypu nebyl nalezen. Stejně tak nebyla žádná asociace mezi ani jedním z polymorfizmů a nadváhou, obezitou nebo hypertenzí. OR (95% CI) pro nadváhu, obezitu a hypertenzi se nijak nelišil u příslušných genotypů. V této velké náhodné skupině dospělých mužů nejsou obměny v ADRB2 genu nijak vázány na krevní tlak, obezitu ani tukovou distribuci.

1.5. STEROL REGULATORY ELEMENT-BINDING TRANSCRIPTION FACTOR 1

Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP1) a SREBP2 jsou strukturně podobné proteiny řídící homeostázi cholesterolu tím, že stimulují transkripci sterol-regulovaných genů. SREBP1 existuje ve dvou variantách (a nebo c) a je syntetizován jako 125kDa prekurzor, který je připojen k jaderné

membráně a endoplazmatickému retikulu. SREBF1 gen lemuje LDLR gen, aktivuje jeho transkripci v buňkách ochuzených o sterol a je tlumen sterolem.

Hua, X. a kol. (1995) analýzou lidských a hlodavčích hybridů tělesných buněk a fluorescenční in situ hybridizací zmapovali SREBF1 gen v poloze 17p11.2.

SREBF1c, je transkripční faktor regulující lipidovou homostázi aktivací genů zapojených v metabolismu lipidů a glukózy. To je důvod, proč se domníváme, že je velmi stejně jako ADRB2 horkým kandidátem na gen ovlivňující obezitu. Doposud byla publikována pouze jedna práce zabývající se vztahem polymorfizmů SREBF1c genu a obezitou zaměřená na francouzskou populaci. Na rozdíl od nich jsme se my zabývali polymorfizmem v poloze 5'7796T>C označeným rs1889018.

Eberle a kol. (2008) učinili SREBF-1 molekulární zobrazování 40 nepříbuzných pacientů přes PCR/single-strand conformation polymorphism a to odhalilo celkem 19 SNP. Šest jich bylo zgenotypizováno za účelem asociační studie velkého **francouzského** obézního i neobézního souboru. Výsledky tohoto týmu poukazují na roli SREBF-1 genu v genetické predispozici metabolických onemocnění, jako je obezita, diabetes 2. typu nebo dyslipidemie.

Grarup a kol. (2008) genotypizovali čtyři varianty SREBF1 genu **dánské** populační studie (n = 6,070) zahrnující jak osoby s diabetem 2. typu, tak lidi s glukózovou tolerancí. Menšinové alely rs2297508, rs11868035 a rs1889018 byly spojeny s mírně zvýšeným rizikem diabetu 2. typu (rs2297508: OR 1.17 [95% CI 1.05-1.30], P = 0.003), což bylo potvrzeno i meta-analýzou všech publikovaných studií (rs2297508 G-alela: 1.08 [1.03-1.14] na alelu, P = 0.001). Alela rs1889018 je navíc spojena se zastupující mírou inzulinové senzitivity (P = 0.03). V této populaci jsou s diabetem vztažené alely diskrétně asociovány s hyperglykemií pravděpodobně kvůli snižování inzulinové senzitivity.

Harding a kol. (2006) vykonali genotypizaci šesti SREBF1c SNP pro vztah s diabetes melitus 2. typu a koncentrací plazmové glukózy v **Anglii**. V této case-control studii nositelé minoritní alely rs11868035 měli signifikantně zvýšené riziko vzniku diabetu (OR=1.20 [95% CI 1.04-1.38], p=0.015). Rovněž i tři další SNP (rs2236513, rs6502618 and rs1889018), umístěné v 5' regionu, byly signifikantně spojeny s rizikem diabetu (OR > or =1.21, p< or =0.006). K tomu dva SNP (rs2236513 and rs1889018) v 5' oblasti byly slabě (p<0.09) spojeny s koncentracemi plazmové glukózy. Vzácní homozygoti měli vyšší (p<=0.05) glukózovou koncentraci 120 min po námaze ve srovnání s nositeli standardní alely. Našli důkaz pro vztah polymorfizmů na 5' region SREBF1c genu s rizikem diabetu 2. typu a koncentrací plazmové glukózy.

2 Metodika

2.1. Design studie

Jako cílový polymorfizmus byl zvolen polymorfizmus Glu27Gln (rs1042714; B27) beta2-adrenergního receptoru (ADRB2), a to na základě dřívějších studií provedených v zahraničí, jejichž výsledky jsou vzájemně v rozporu. Druhým zvoleným polymorfizmem byl rs1889018 polymorfizmus SREBF-1 genu, který se vyskytuje v poloze 5'7796T>C. Získali jsme data a vzorky genomické DNA (stěry z buňkové sliznice) od českých žen (n=120) a mužů (n=81). Ze 120 vzorků obézních žen bylo 65 získáno z pražské ordinace zabývající se léčbou obezity - Prevence 2000. Kritériem bylo, aby ženy byly ve věku mezi 18 a 57 lety, hraniční Body Mass Index čínil 27kg/m². Nesměly rovněž prodělat onkologické (maligní nádory) ani jiné vážné onemocnění. Zbytek žen byly kontrolní osoby české národnosti. Soubor mužů tvořilo 49 mužů – kontrolních osob a 32 mužů trpících erektilní dysfunkcí. Osoby zúčastněné ve studii podepsaly informovaný souhlas se zařazením do této studie. Projekt byl schválen etickou komisí Úrazové nemocnice v Brně.

Tabulka č. 6: Popisná statistika celého souboru

	počet osob	průměr	min.	max.	směrodatná odchylka
věk	97	44	22	69	12.26338
výška	200	173	156	198	8.79967
hmotnost	201	87	16	182	20.29134
obvod pasu	185	93	65	148	14.39661
BMI	200	29	18	64	6.86247

2.2. Biologická měření

Provedli jsme antropometrická měření, při nichž nás zajímaly tyto **fenotypové znaky**: výška, váha, BMI, obvod pasu a hýždí, obvody LDK a PDK třísla, nad kolenem, lýtka; WHR (pás/boky). Celé znění dotazníku je uvedeno v Přílohách. Použita byla také BIA s využitím dvou elektrod přiložených k ruce a noze. Jednalo se o přístroj BODYSTAT (vývojáři a distributoři Britain's leading bioimpedance systems, BODYSTAT(R)). Přenosný BODYSTAT 1500 - jednotka monitorující tělesné složení měřící velikost impedance těla pouze v dané frekvenci 50 KHz. Zadává se věk, pohlaví, výška váha, pohyb. aktivita. **Měřené parametry** se skládaly z: tuk%, tuk (kg), aktivní hmotnost %, aktivní hmotnost(kg), celková tělesná váha, voda%, voda(l), BMI, bazální metabolismus, odhadovaná potřeba energie, impedance. Je to impedometr, který si sám změří impedanci a na základě toho vypočítá složení těla. Je-li tělo vlhčí, je tím pádem vodivější, impedance nižší, vyjde proto více svaloviny, méně tuku a naopak. Nejpresnější výpočty jsou při impedanci kolem 500 Ω.

2.3. Genetická analýza

2.3.1. Izolace genomické DNA ze stěru z bukalní sliznice

Izolační kit UltraClean™ Blood Spin DNA

1. Do připravených mikrozkušavek jsme **napipetovali 400 µl roztoku TD1 (B1) a 30 µl proteinázy K.**
2. Stěrovku jsme vložili do označené mikrozkušavky a sterilními nůžkami odstříhli štěteček.
3. Mikrozkušavky jsme vložili do termotřepačky (Biosan) vytemperované na 56°C. Nastavili jsme třepání na 600 rpm a inkubovali 20 min. Poté jsme mikrozkušavky krátce stočily na centrifuze.
4. Sterilní pinzetou jsme vyjmuli štěteček a vyhodili. Ke každému lyzátu jsme **přidali 400 µl roztoku B2.** Jemně jsme zvortexovali a zcentrifugovali.
5. Přenesli jsme veškerý obsah mikrozkušavky do kolonky.
6. Centrifugovali jsme 1 min při 13 000 x g.
7. Přendali jsme kolonku do nové mikrozkušavky.
8. **Do kolonky jsme přidali 500 µl roztoku B3.**
9. Centrifugovali jsme 30 sekund při 13 000 x g.
10. Vyjmuli jsme kolonku z mikrozkušavky, obsah mikrozkušavky vylili do odpadu a vrátili do ní kolonku.
11. **Do kolonky jsme přidali 500 µl roztoku B4.**
12. Centrifugovali jsme 30 sekund při 13 000 x g .
13. Vyjmuli jsme kolonku z mikrozkušavky, obsah mikrozkušavky vylili do odpadu a vrátili do ní kolonku.
14. Znovu jsme centrifugovali 30 sekund při 13 000 x g.
15. **Opatrně jsme vyjmuli kolonku a přenesli ji do nové mikrozkušavky, aniž bychom se dotkli roztoku B4 na dně původní mikrozkušavky.**
16. **Roztok B5 jsme inkubovali asi 5 minut ve vodní lázni (termotřepačce) při 65°C. Do středu kolonky jsme napipetovali 100 µl roztoku B5 předehřátého na 65°C.**
17. Centrifugovali jsme 1 min při 13 000 x g.

18. Odstranili jsme kolonku a zavřeli víčko mikrozkušavky. Genomická DNA byla takto připravena pro různé aplikace.

2.3.2. Detekce polymorfizmu rs1042714, záměna C/G v peptidovém řetězci genu pro ADRB2

Pro PCR reakci polymorfizmu rs1042714 genu pro ADRB2 byly použity primery:

5'- CGC CGG ACC ACG ACG TCA CGC CG - 3',
5'- TGC AGA CGC ACG AAC TTG GCA ATG G - 3'

Reakční směs o celkovém objemu 47,5 µl obsahovala:

50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,4); 5 mM MgCl₂; 1 µM každého z primerů; 0,5 mM dNTP; 2,5 µl genomové DNA; 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykléru Techne Touchgene Gradient. Po počáteční denaturaci trvající 2,5 minuty při 96°C, byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech:

denaturace 30 s při 96°C; annealing 20 s při 55°C; extenze 20 s při 72°C. Po 32 cyklech byla použita finální extenze 5 minut při 72°C. Celková délka amplifikovaného fragmentu byla 139 bp.

Následovala restrikční analýza:

10 µl PCR amplifikátu bylo smícháno s 1 µl pufru TANGO (Fermentas: 33 mM Tris pH 7,9 při 37°C; 10 mM (CH₃COO)₂Mg.4H₂O, 66 mM CH₃COOK, 0,1 mg/ml BSA) a dále s 1 µl (10 U) restrikčního enzymu MspI, který štěpí DNA v následující sekvenci:

5'- C C G G - 3'
3'- G G C C - 5'

Poté následovala inkubace na vodní lázni při 37°C po dobu 4 hodin.

Z amplifikovaného PCR fragmentu o délce 139 bp odštěpí restrikční enzym standardně úsek o délce 22 bp, čímž vznikne produkt o délce 117 bp.

Gelová elektroforéza restrikčních fragmentů byla provedena na 2,5 % agarózovém gelu (EliPhore) barveném ethidium bromidem při 80 V po dobu jedné hodiny dvaceti minut. Výsledný gel byl prosvícen transiluminátorem a vyfotografován digitálním fotoaparátem Olympus (CAMEDIA C-3030).

Byly detekovány následující fragmenty:

neštěpený fragment o délce 117 bp, který značil genotyp GG; fragment o délce 139 bp charakterizoval genotyp CC; fragmenty o délce 139 bp a 117 bp identifikovaly genotyp GC.

2.3.3. Detekce polymorfizmu rs1889018, záměna C/T v peptidovém řetězci genu pro SREBF1

Pro PCR reakci polymorfizmu rs1042714 genu pro ADRB2 byly použity primery:

5'- AGA GGC TGC TTC CCA GAA A - 3',
5'- CCT GGA CCC AGC AAA CAG - 3'

Reakční směs o celkovém objemu 47,5 µl obsahovala:

50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,4); 5 mM MgCl₂; 1 µM každého z primerů; 0,5 mM dNTP; 2,5 µl genomové DNA; 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykléru Techne Touchgene Gradient. Po počáteční denaturaci trvající 2,5 minuty při 96°C, byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech:

denaturace 30 s při 96°C; annealing 20 s při 60°C; extenze 20 s při 72°C. Po 32 cyklech byla použita finální extenze 5 minut při 72°C. Celková délka amplifikovaného fragmentu byla 156 bp.

Následovala restriční analýza:

10 μ l PCR amplifikátu bylo smícháno s 1 μ l Mae III pufru (Roche: 40 mM Tris-HCl, 550 mM NaCl, 12 mM MgCl₂, 14 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8.2 při 55°C) a dále s 1 μ l (10 U) restričního enzymu Mae III, který štěpí DNA v následující sekvenci (N značí libovolnou bázi):



Poté následovala inkubace na vodní lázni při 55°C po dobu 1 hodiny.

Z amplifikovaného PCR fragmentu o délce 156 bp odštěpí restriční enzym standardně úsek o délce 31 bp, čímž vznikne produkt o délce 125 bp.

Gelová elektroforéza restričních fragmentů byla provedena na 2,5 % agarózovém gelu (EliPhore) barveném ethidium bromidem při 80 V po dobu jedné hodiny dvaceti minut. Výsledný gel byl prosvícen transiluminátorem.

Byly detekovány následující fragmenty:

neštěpený fragment o délce 125 bp, který značil genotyp GG; fragment o délce 156 bp charakterizoval genotyp AA; fragmenty o délce 156 bp a 125 bp identifikovaly genotyp AG.

2.4. Statistická analýza

2.4.1. Analýza rozptylu (ANOVA)

Ke zjištění, zda existuje asociace mezi naměřenými hodnotami a zkoumaným polymorfizmem, jsme použili software Statistica a v ní tzv. analýzu rozptylu (ANOVA).

Dovedeme tak zkoumat **závislost** kvantitativní proměnné y na třídícím klasifikačním faktoru (kategoriální proměnná anebo kvantitativní s malým počtem obměn). Získaný statistický soubor obsahuje n statistických jednotek rozdělených do k dílčích podsouborů (skupin) podle obměn faktoru.

$$y_{ij}, i = 1, K, k, j = 1, K, n_i$$

Cílem je porovnání úrovně (středních hodnot) v několika skupinách.

2.4.2. Korelace - korelační koeficient

Korelační analýza se zabývá mírou závislosti náhodných dat. Korelační koeficienty slouží jako míry vyjádření "těsnosti lineární vazby". Korelační analýza popisuje lineární vztahy mezi veličinami.

PÁROVÝ (P) KOEFICIENT (R/R_{XY}):

$$R = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{(n - 1) s_x s_y} \quad R = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

Korelační koeficient R může nabývat hodnot od -1 do +1. Párové korelační koeficienty se používají pro vyjádření korelace mezi x a y.

2.4.3. Povrchové 3D grafy

Tento graf nám umožňuje studovat závislost dvou zvolených faktorů na třetím. V tom je rozdíl od obyčejného 2D histogramu.

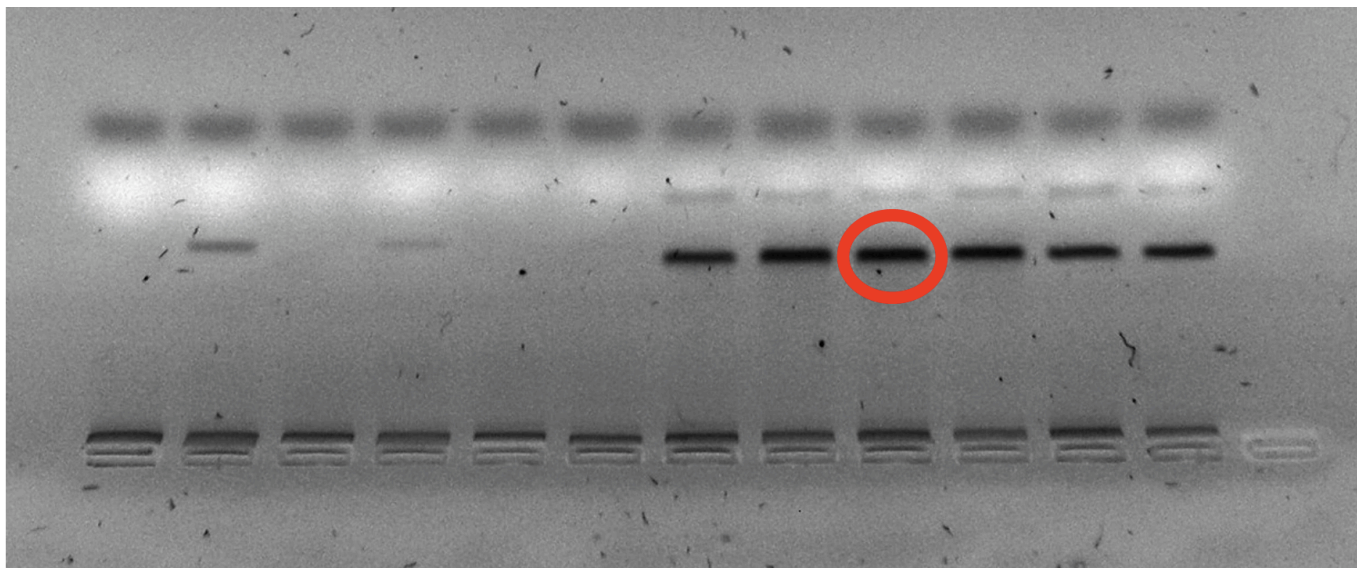
3 Výsledky

3.1. rs1042714

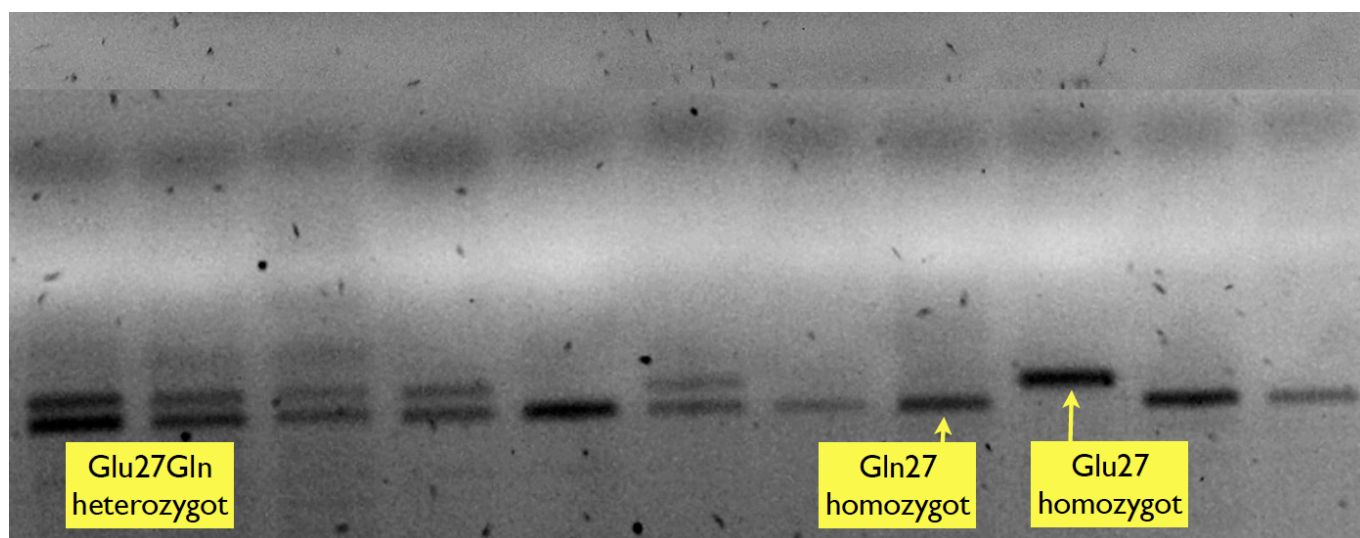
Při analýze polymorfizmu rs1042714 jsme použili PCR–RFLP metodu, k níž jsme si zvolili tzv. mismatch primer (**Obr. 2.1.**). Pomocí elektroforézy jsme detekovali příslušné genotypy (**Obr. 2.2.**).

Po analýze vztahu genotypů k naměřeným hodnotám bylo zjištěno, že polymorfizmus nekoreluje s naměřenými hodnotami (**tabulka 2.1.**). Kladné nebo záporné korelace mezi naměřenými znaky navzájem jsou znázorněny pomocí 3D povrchových grafů (viz. přílohy).

Obr. č. 2.1.: Analýza pro zvolení nejvhodnější annealingové teploty pro detekci Glu27Gln polymorfizmu genu pro ADRB2



Obr. č. 2.2.: PCR–RFLP analýza polymorfizmu Glu27Gln genu pro ADRB2



Tabulka č. 2.1.: Korelace měřených hodnot - červeně vyznačené korelace jsou významné na hladině pravděpodobnosti $p < 0.01000$; znaménko +/- ukazuje směr korelace

	výška	hmotnost	obvod pasu	rs1042714	BMI	L4-L5	boky
výška	1,000000	0,395382	0,191172	-0,083536	-0,080972	0,292835	0,107289
hmotnost	0,395382	1,000000	0,764632	0,101850	0,876653	0,842110	0,422911
obvod pasu	0,191172	0,764632	1,000000	0,087426	0,736776	0,900105	0,474388
rs1042714	-0,083536	0,101850	0,087426	1,000000	0,146680	0,057311	-0,039751
BMI	-0,080972	0,876653	0,736776	0,146680	1,000000	0,760429	0,415000
L4-L5	0,292835	0,842110	0,900105	0,057311	0,760429	1,000000	0,491644
boky	0,107289	0,422911	0,474388	-0,039751	0,415000	0,491644	1,000000
hýždě	-0,064331	0,500359	0,335529	0,104589	0,587048	0,345408	0,208660
WHR	-0,081346	-0,194760	0,237338	0,094732	-0,189261	0,047328	-0,024122
PDK třísko	0,114661	0,667562	0,354094	-0,133646	0,656583	0,406428	0,176881
PDK nad kolenem	0,161313	0,583084	0,165205	0,225388	0,535305	0,240551	0,140600
PDK lýtko	0,141221	0,524548	0,127824	0,156609	0,480358	0,280558	0,078959
LDK třísko	0,068417	0,528986	0,111268	-0,047309	0,537869	0,207591	0,144319
LDK nad kolenem	0,150919	0,754475	0,355560	0,242458	0,741421	0,474696	0,302617
LDK lýtko	0,255248	0,723662	0,336093	0,144996	0,642546	0,484830	0,142444
tuk%	-0,201637	0,637893	0,650111	0,085337	0,796633	0,676120	0,386924
tuk (kg)	0,114557	0,908121	0,783879	0,106932	0,923948	0,826472	0,450885
akt. hmotnost%	0,191063	-0,642118	-0,645475	-0,050397	-0,796997	-0,689140	-0,397625
akt. hmotnost (kg)	0,693754	0,777296	0,456218	0,077551	0,480292	0,545966	0,221820
voda%	-0,018370	-0,669404	-0,603374	0,013638	-0,717487	-0,663781	-0,339951
voda (l)	0,536260	0,833885	0,555575	0,144233	0,624356	0,621230	0,291392
bazál. metab. (kJ/d)	0,629769	0,630542	0,342916	0,008557	0,348408	0,450487	0,152461
impedance	-0,056457	-0,581672	-0,421721	-0,213414	-0,605821	-0,408649	-0,208616
CEV kJ/d	0,641350	0,713636	0,382755	0,093774	0,430758	0,495468	0,155739

	hýždě	WHR	PDK třísko	PDK nad kolenem	PDK lýtko	LDK třísko
výška	-0,064331	-0,081346	0,114661	0,161313	0,141221	0,068417
hmotnost	0,500359	-0,194760	0,667562	0,583084	0,524548	0,528986
obvod pasu	0,335529	0,237338	0,354094	0,165205	0,127824	0,111268
rs1042714	0,104589	0,094732	-0,133646	0,225388	0,156609	-0,047309
BMI	0,587048	-0,189261	0,656583	0,535305	0,480358	0,537869
L4-L5	0,345408	0,047328	0,406428	0,240551	0,280558	0,207591
boky	0,208660	-0,024122	0,176881	0,140600	0,078959	0,144319
hýždě	1,000000	-0,314713	0,494788	0,307064	0,226909	0,339991
WHR	-0,314713	1,000000	-0,308102	-0,372112	-0,206657	-0,411105
PDK třísko	0,494788	-0,308102	1,000000	0,377150	0,268896	0,694001
PDK nad kolenem	0,307064	-0,372112	0,377150	1,000000	0,700950	0,495882
PDK lýtko	0,226909	-0,206657	0,268896	0,700950	1,000000	0,420947
LDK třísko	0,339991	-0,411105	0,694001	0,495882	0,420947	1,000000
LDK nad kolenem	0,462601	-0,337161	0,589938	0,730083	0,695583	0,591885
LDK lýtko	0,334287	-0,288338	0,487524	0,633453	0,824622	0,488388
tuk%	0,419711	0,005670	0,425131	0,330363	0,216390	0,310642
tuk (kg)	0,521707	-0,135406	0,608970	0,508569	0,382388	0,464818
akt. hmotnost%	-0,422866	-0,002588	-0,440070	-0,338270	-0,275154	-0,322392
akt. hmotnost (kg)	0,285607	-0,227264	0,503085	0,478188	0,520471	0,428023
voda%	-0,368833	0,011034	-0,518809	-0,325527	-0,243033	-0,429634
voda (l)	0,373563	-0,228403	0,501197	0,529468	0,538099	0,401063
bazál. metab. (kJ/d)	-0,151739	-0,209722	0,403773	0,401143	0,493527	0,361636
impedance	-0,373899	0,210936	-0,341741	-0,425274	-0,503172	-0,323351
CEV kJ/d	0,279354	-0,252267	0,498506	0,455979	0,557628	0,419399

	LDK nad kolenem	LDK lýtko	tuk%	tuk (kg)	akt. hmotn.%
výška	0,150919	0,255248	-0,201637	0,114557	0,191063
hmotnost	0,754475	0,723662	0,637893	0,908121	-0,642118
obvod pasu	0,355560	0,336093	0,650111	0,783879	-0,645475
rs1042714	0,242458	0,144996	0,085337	0,106932	-0,050397
BMI	0,741421	0,642546	0,796633	0,923948	-0,796997
L4-L5	0,474696	0,484830	0,676120	0,826472	-0,689140
boky	0,302617	0,142444	0,386924	0,450885	-0,397625
hýždě	0,462601	0,334287	0,419711	0,521707	-0,422866
WHR	-0,337161	-0,288338	0,005670	-0,135406	-0,002588
PDK třísko	0,589938	0,487524	0,425131	0,608970	-0,440070
PDK nad kolenem	0,730083	0,633453	0,330363	0,508569	-0,338270
PDK lýtko	0,695583	0,824622	0,216390	0,382388	-0,275154
LDK třísko	0,591885	0,488388	0,310642	0,464818	-0,322392
LDK nad kolenem	1,000000	0,788171	0,462062	0,666692	-0,470196
LDK lýtko	0,788171	1,000000	0,353483	0,612831	-0,329461
tuk%	0,462062	0,353483	1,000000	0,885888	-0,974169
tuk (kg)	0,666692	0,612831	0,885888	1,000000	-0,852946
akt. hmotnost%	-0,470196	-0,329461	-0,974169	-0,852946	1,000000
akt. hmotnost (kg)	0,606846	0,663197	0,021684	0,452897	-0,043527
voda%	-0,458405	-0,366976	-0,922849	-0,850732	0,919654
voda (l)	0,668959	0,699092	0,157982	0,565938	-0,165240
bazál. metab. (kJ/d)	0,501140	0,598150	-0,015641	0,338334	-0,017157
impedance	-0,562167	-0,594120	-0,070322	-0,385645	0,078962
CEV kJ/d	0,575258	0,663356	-0,040181	0,376773	0,002666

	akt. hmotn. (kg)	voda%	voda (l)	bazál. metab. (kJ/d)	impedance	CEV kJ/d
výška	0,693754	-0,018370	0,536260	0,629769	-0,056457	0,641350
hmotnost	0,777296	-0,669404	0,833885	0,630542	-0,581672	0,713636
obvod pasu	0,456218	-0,603374	0,555575	0,342916	-0,421721	0,382755
rs1042714	0,077551	0,013638	0,144233	0,008557	-0,213414	0,093774
BMI	0,480292	-0,717487	0,624356	0,348408	-0,605821	0,430758
L4-L5	0,545966	-0,663781	0,621230	0,450487	-0,408649	0,495468
boky	0,221820	-0,339951	0,291392	0,152461	-0,208616	0,155739
hýždě	0,285607	-0,368833	0,373563	-0,151739	-0,373899	0,279354
WHR	-0,227264	0,011034	-0,228403	-0,209722	0,210936	-0,252267
PDK třísko	0,503085	-0,518809	0,501197	0,403773	-0,341741	0,498506
PDK nad kolenem	0,478188	-0,325527	0,529468	0,401143	-0,425274	0,455979
PDK lýtko	0,520471	-0,243033	0,538099	0,493527	-0,503172	0,557628
LDK třísko	0,428023	-0,429634	0,401063	0,361636	-0,323351	0,419399
LDK nad kolenem	0,606846	-0,458405	0,668959	0,501140	-0,562167	0,575258
LDK lýtko	0,663197	-0,366976	0,699092	0,598150	-0,594120	0,663356
tuk%	0,021684	-0,922849	0,157982	-0,015641	-0,070322	-0,040181
tuk (kg)	0,452897	-0,850732	0,565938	0,338334	-0,385645	0,376773
akt. hmotnost%	-0,043527	0,919654	-0,165240	-0,017157	0,078962	0,002666
akt. hmotnost (kg)	1,000000	-0,129387	0,957651	0,842302	-0,687283	0,965698
voda%	-0,129387	1,000000	-0,158924	-0,123072	-0,075193	-0,091346
voda (l)	0,957651	-0,158924	1,000000	0,769553	-0,819938	0,900263
bazál. metab. (kJ/d)	0,842302	-0,123072	0,769553	1,000000	-0,485147	0,844910
impedance	-0,687283	-0,075193	-0,819938	-0,485147	1,000000	-0,638159
CEV kJ/d	0,965698	-0,091346	0,900263	0,844910	-0,638159	1,000000

Jak již bylo řečeno dříve, jedním z cílů bylo zjištění frekvence tohoto polymorfizmu v české populaci, kterou shrnuje **tabulka č. 2.3.**, zvláště pro obě pohlaví a následně u celého souboru. Hladiny pravděpodobnosti pro vztahy různých genotypů s BMI, hmotností a obvodem pasu byly vždy vyšší než 0.05 (0.53; 0.99; 0.73 popořadě). Grafický záznam analýzy rozptylu je zahrnut v přílohách.

Odds of ratio (OR) nás informuje o podílu obézních a neobézních nositelů dané alely (**tabulka 2.2.**). Z toho vidíme, jestli se u obézních vyskytují častěji genotypy s mutantní alelou nebo naopak standardní forma.

Tabulka č. 2.2.: Výskyt genotypů rs1042714 polymorfizmu ADRB2 genu u obézních a neobézních

Genotyp	Obézní	Neobézní	OR
CC	7	10	0.7
CG	15	29	0.52
GG	11	32	0.34
C	22	39	0.56
G	26	61	0.43

Tabulka č. 2.3.: Genotypové a alelické frekvence polymorfizmu rs1042714

pohlaví	n	CC	CG	GG	C	G
muži	49	9 (0.18)	18 (0.37)	22 (0.45)	0.37	0.63
ženy	120	31 (0.26)	54 (0.45)	35 (0.29)	0.48	0.52
smíšené	169	40 (0.24)	72 (0.42)	57 (0.34)	0.45	0.55

3.2. rs1889018

Tabulka č. 2.4.: Výskyt genotypů rs1889018 polymorfizmu SREBF-1 genu u obézních a neobézních

Genotyp	Obézní	Neobézní	OR
CC	6	34	0.18
CI	21	25	0.84
II	6	7	0.86
C	27	59	0.46
I	27	32	0.84

Tabulka č. 2.5.: Genotypové a alelické frekvence polymorfizmu rs1889018

Pohlaví	n	CC	CI	II	A	G
muži	48	17 (0.35)	24 (0.5)	7 (0.15)	0.60	0.40
ženy	55	24 (0.44)	24 (0.44)	7 (0.12)	0.65	0.35
smíšené	103	41 (0.40)	48 (0.47)	14 (0.13)	0.63	0.37

Tabulka č 2.5. zaznamenává analýzu rozptylu - vztah polymorfizmu genu pro SREBF1c s hmotností, BMI a obvodem pasu. Napravo je potom uvedena hladina pravděpodobnosti, která musí být, aby šlo o signifikantní vztah nižší než 0.05. Grafický záznam je součástí Příloh.

Tabulka č. 2.3: Asociační analýza vztahu rs1889018 polymorfizmu s obezitou

znak	AA	AG	GG	P
hmotnost (kg)	69.9 (64.0-75.8)	83.3 (77.8-88.7)	82.2 (71.8-92.5)	0.00386
BMI (kg/m ²)	23.4 (21.8-24.9)	27.1 (25.7-28.6)	27.1 (24.4-29.8)	0.00156
obvod pasu (cm)	82.1 (77.2-86.9)	91.9 (87.3-96.5)	91.2 (83.0-99.5)	0.01186

4 Diskuse

V prvé řadě je třeba poznamenat, že nebyl nalezen žádný vztah mezi polymorfizmem Glu27 Gln genu pro ADRB2 a obezitou. Z toho vyplývá, že se potvrdil výsledek meta-analýzy a tedy, že u evropské populace se nejedná o hlavní faktor zvyšující riziko obezity. Výsledky analýzy rozptylu jsou uvedeny v přílohách. Součástí našeho souboru byli také muži s erektní dysfunkcí, jejichž genotypy a fenotypy nám ovšem posunovaly výsledky směrem k pozitivní asociaci polymorfizmu s obezitou, což je pravděpodobně způsobeno jejich dispozicemi ke kardiovaskulárním chorobám. Výsledky proto nejsou v práci uvedeny. Naše domněnka je taková, že stejně jak je uvedeno v meta-analýze, malé soubory jedinců mohou být v některých studovaných populacích příčinou klamného pozitivního vztahu. Z poměrů počtu obézních a neobézních nevyhází, že by se GC a CC genotyp vyskytoval častěji u obézních, je tomu právě naopak. Mutantní alela má na naši populaci protektivní efekt.

Porovnáme-li naši frekvenci Glu27Gln s rozbořem 120 jedinců evropské populace, vidíme, že máme téměř poloviční výskyt standardního genotypu a tím pádem o něco vyšší frekvenci genotypu CG a GG. Alelické frekvence se u Čechů nepatrně přiklání ke Glu27 alele (0.55). Můžeme říci, že není žádný výrazný rozdíl ve frekvenci Glu27 alely mezi muži a ženami.

Tabulka č. 3.1.: Frekvence polymorfizmu rs1042714 genu pro ADRB2 a obou alel u Evropanů (*HapMap-CEU*)

n	CC	CG	GG	C	G
120	0.383	0.300	0.317	0.533	0.467

V rámci meta-analýzy se blížíme frekvencí Glu27 alely nejvíce Spojeným státům, Kanadě (Garenc a kol., 2003), švédským ženám (Large a kol., 1997) a rakouským ženám (Oberkofler a kol., 2003).

Při pozorování TC varianty polymorfizmu genu pro SREBP-1 jsme zjistili při porovnání s homozygotem AA pozitivní vztah s hmotností (95% CI, $p=0.004$, 83.3 vs. 69.9), BMI ($p=0.002$, 95% CI, 27.1 vs. 23.4) a obvodem pasu ($p=0.012$, 95% CI, 91.9 vs. 82.1). Obdobný vliv na hmotnost, BMI a obvod pasu má i homozygotní GG genotyp (průměrné BMI - 27.1, hmotnost - 82.2, obvod pasu - 91.2).

Vypočítané frekvence jsme opět srovnávali s daty pro Evropany z projektu HapMap-CEU. Je vidět, že v naší populaci máme pouze nepatrně více nositelů mutantní alely. Naše frekvence nejsou nijak nadstandardní. Čeští muži a ženy mají vzájemně podstatě shodnou frekvenci obou alel.rs

Tabulka č. 3.2: Frekvence polymorfizmu rs1889018 genu pro SREBF-1 a obou alel u Evropanů (*HapMap-CEU*)

n	GG	AG	AA	G	A
118	0.102	0.356	0.542	0.280	0.720

OR hodnoty ukazují na přibližně dvakrát vyšší výskyt mutantní alely u obézních oproti standardní alele. Standardní genotyp (AA homozygot) je přítomen jen v 18% obézních jedinců.

Porovnáním ženy vs. muži u celého souboru jsme zjistili, že české ženy mají v průměru vyšší BMI než muži, jsou nižší postavy, ale muži mají větší obvod pasu. Z toho vyplývá, že ženy mají lepší rozložení tuku v těle.

Interpretaci výsledků 3D povrchových grafů můžeme pojmovit následovně:

1. Obsah tělesného tuku při snižování od cca 50% dolů a stoupajícím BMI roste obsah tělesné vody %.
2. S klesajícím obvodem PDK lýtka pod 55cm a rostoucím obvodem od 80cm PDK třísla klesá prudce WHR (gynoidní obezita).
3. Na pokles WHR se váže i vzrůst hmotnosti od 120kg a růst výšky od 175cm. WHR naopak stoupá při vzrůstající hmotnosti od 100cm a vzrůstu výšky nad 170cm.

4. Celkový obsah vody prudce stoupá při poklesu aktivního hmotnosti pod 50% a poklesu celkového množství tuku od 50%.

5 Závěr

Výstupem této práce bude odborná publikace, která bude informovat o získaných výsledcích, tedy o skutečnosti, že u české populace rovněž polymorfismus Glu27Gln ADRB2 receptoru neovlivňuje dispozice k obezitě. Na druhou stranu, ale zjištěním vztahu polymorfizmu rs1889018 genu pro SREBF1 s obezitou u Čechů možná upozorníme na vliv tohoto polymorfizmu na váhu jedince. Účastnice této populační studie samozřejmě informujeme o jejich výsledku (budou jim zaslány výsledky měření, které předají svému obezitologovi). Rovněž data, která jsme získali studiem korelace měřených hodnot budou předána lékařům, kteří o ně mají veliký zájem a chtějí je využít při určování diagnózy.

Ve své práci jsem podrobněji rozebral studie zabývající se vztahem zkoumaných polymorfizmů s obezitou (event. diabetem). Tento rozbor má své opodstatnění.

Pevně věřím, že nový genetický marker rizika vzniku obezity v budoucnosti může pomoci lékařům k rozhodnutí o dalším postupu léčby a především pak vážně nemocným pacientům ke zlepšení kvality jejich života.

6 Literatura

6.1. Použitá literatura

- 1 About BMI for Adults. Center for disease control and prevention [online]. 2008 [cit. 2009-01-10], s. 1-1. Dostupný z WWW: <http://www.cdc.gov/nccdphp/dnpa/healthyweight/assessing/bmi/adult_BMI/about_adult_BMI.htm>.
- 2 ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter; Molecular Biology of the Cell. 5th rev. edition. New York: Garland Science, 2008. 4. ISBN 978-0815341055.
- 3 CAMBELL, Marry K., FARRELL, Shawn O. Biochemistry. [s.l.] : Brooks/Cole, Cengage Learning, 2006. 803 s. 5. ISBN 978-0-534-40521-2.
- 4 FÖLSCH, U. R., KOCHSIEK, K., SCHMIDT, R. F. . Patologická fyziologie. 1. vyd. [s.l.] : Grada, 2003. 588 s. ISBN 80-247-0319-X.
- 5 GANONG, William F . Přehled lékařské fyziologie. 1. vyd. [s.l.] : H+H, 2002. 681 s. ISBN 80-85787-36-9.
- 6 GROFOVÁ, Zuzana. Nutriční podpora : Praktický rádce pro sestry. 1. vyd. Praha : Grada, 2007. 248 s. ISBN 978-80-247-1868-2.
- 7 HAINER, Vojtěch a kol. Základy klinické obezitologie. Praha : Grada Publishing, 2004. 372 s. ISBN 80-247-0233-9.
- 8 HATINA, Jiří, SYKES, Bryan. Lékařská genetika : Problémy a přístupy. [s.l.] : Academia, 2002. 296 s. ISBN 80-200-0700-8.
- 9 Healthshop.cz [online]. 2009 , 2009 [cit. 2009-01-18]. Internetový obchod. Český. Dostupný z WWW: <<http://www.healthshop.cz/zbozi/51-co-je-bia>>.
- 10 HOLEČEK, Milan. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. [s.l.] : 80-247-1562-7, 2006. 288 s. ISBN 80-247-1562-7.
- 11 Hua, X.; Wu, J.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S.; Hobbs, H. H. : Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. Genomics 25: 667-673, 1995.
- 12 Jalba, M.S., G.G. Rhoads, and K. Demissie, Association of codon 16 and codon 27 beta 2-adrenergic receptor gene polymorphisms with obesity: a meta-analysis. Obesity (Silver Spring), 2008. 16(9): p. 2096-106.
- 13 JINDRA, Perušicová. Co je nového na cestě od obezity po diabezitu, aneb, Co by měl o diabezitě vědět pacient. 1. vyd. Praha : Medica Healthworld, 2007. 223 s. ISBN 978-80-904002-0.
- 14 JINDŘICH, Mourek. Fyziologie : Učebnice pro studenty zdravotnických oborů. 1. vyd. [s.l.] : GRADA, 2005. 204 s. ISBN 80-247-1190-7.

- 15 Kobilka, B.K., R.A.F. Dixon, T. Frielle, H.G. Dohlman, M.A. Bolanowski, I.S. Sigal, T.L. Yang-Feng, U. Francke, M.C. Caron, and F. Lefkowitz. 1987. cDNA for the human β_2 -adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:46–50.
- 16 Lafontan M, Sengenès C, Galitzky J a kol. Recent developments on lipolysis regulation in humans and discovery of a new lipolytic pathway. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24(Suppl 4):S47–S52.
- 17 MARIEB , Elaine N., HOEHN, Katja. *Human Anatomy & Physiology.* [s.l.] : Benjamin Cummings, 2006. 1159 s. 7. ISBN 978-0805359091.
- 18 MCPHEE, STEPHEN, J., GANONG, WILLIAM, F. *PATHOPHYSIOLOGY OF DISEASE: AN INTRODUCTION TO CLINICAL MEDICINE.* [S.L.] : MCGRAW-HILL MEDICAL, 2005. 784 s. 5. ISBN 978-0071441599.
- 19 N. MARIEB , ELAINE, HOEHN, KATJA. *HUMAN ANATOMY & PHYSIOLOGY.* JASON MALLEY, ROBERT PANCOTTI, LESTER A. SHEINIS, CATHERINE H. SAGGESE; BENJAMIN CUMMINGS; ALEXANDRA NICKERSON. 7TH EDITION. [S.L.] : MCGRAW-HILL, 2006. 1159 s. 7. ISBN 0805359095.
- 20 NEČAS, Emanuel a kol. *Obecná patologická fyziologie.* 2. vyd. [s.l.] : Karolinum, 2006. 380 s. ISBN 802460051X.
- 21 Obezita.cz [online]. c2008 , 2008 [cit. 2009-01-12]. Český. Dostupný z WWW: <<http://www.obezita.cz/>>. [Http://www.obezita.cz/obezita/rizikove-factory/diabetes-cukrovka/](http://www.obezita.cz/obezita/rizikove-factory/diabetes-cukrovka/)
- 22 Obezita.org [online].[2000-] [cit. 2009-01-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.obezita.org/>>.
- 23 Polymorphisms. RCN [online]. 2007 [cit. 2009-01-19], s. 1-1. Dostupný z WWW: <<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/P/Polymorphisms.html>>.
- 24 Reihnsaus E, Innis M, MacIntyre N, Liggett SB. Mutations in the gene encoding for the β_2 -adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:334–339.
- 25 RHOADES, Rodney A. , TANNER , George A. . *Medical Physiology.* [s.l.] : Lippincott Williams & Wilkins, 2003. 781 s. 2. ISBN 978-0781719360.
- 26 RYBKA, Jaroslav. *Diabetes mellitus Komplikace a přidružená onemocnění : Diagnostické a léčebné postupy.* 1. vyd. Praha : Grada, 2007. 320 s. ISBN 978-80-247-1671-8.
- 27 Šerý O., Slabý O., Zvolský P. Genetika alkoholizmu II: souhrn asociačních studií z let 1990-2002 – dopaminové receptory. [s.l.], 2002. 32 s. Laboratoř neurobiologie a molekulární psychiatrie Katedra srovnávací fyziologie živočichů a obecné zoologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Vladimír Šimek, CSc. Psychiatrická klinika 1. LF* Karlova univerzita, Praha. Souborný Referát.
- 28 SILBERNAGL, Stefan, LANG, Florian. *Atlas patofyziologie člověka .* 1. vyd. Praha : GRADA, 2006. 390 s. ISBN 80-7169-968-3.
- 29 SUCHARDA, Petr. Obezita (otylost). *Ordinace.cz : nemoci a vyšetření* [online]. 2004 [cit. 2009-01-11], s. 1-1. Dostupný z WWW: <<http://www.ordinace.cz/clanek/obezita-otylost/>>.
- 30 SVAČINA, Š., BRETŠNAJDROVÁ, A. *Cukrovka a obezita.* 1. vyd. [s.l.] : MAXDORF - MUDr. Jan HUGO, 2003. 80-58912-58-9 s. ISBN 80-58912-58-9.
- 31 SVAČINA, Štěpán. *Klinická dietologie.* 1. vyd. [s.l.] : Grada, 2008. 384 s. ISBN: 978-80-247-2256-6
- 32 TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie.* 4. dopl. vyd. [s.l.] : Grada Publishing, 2004. 772 s. ISBN 80-247-0512-5.
- 33 Typy obezity. *Obezita.com : Centrum pro obezitu a zdravý životní styl* [online]. 200- [cit. 2009-01-10], s. 1-1. Dostupný z WWW: <http://www.obezita.com/typy_obezity.php>.
- 34 Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN. *Aktuální genetika : Multimediální učebnice lékařské biologie, genetiky a genomiky* [online]. c2005-2006 [cit. 2009-01-21]. Dostupný z WWW: <<http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/index.htm>>. [Http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/repetitivni_dna.htm](http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/repetitivni_dna.htm) [http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/geneticka_kartografie.htm](http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/genetika_komplexnich_znaku.htm)

6.2. Studie Glu27Gln polymorfizmu ADRB2 genu

- 1 Bengtsson K, Orho-Melander M, Melander O a kol. β_2 -adrenergic receptor gene variation and hypertension in subjects with type 2 diabetes. *Hypertension* 2001;37:1303–1308.
- 2 Carlsson M, Orho-Melander M, Hedenbro J, Groop LC. Common variants in the β_2 -(Gln27Glu) and β_3 -(Trp64Arg)—adrenoceptor genes are associated with elevated serum NEFA concentrations and type II diabetes. *Diabetologia* 2001;44:629–636.
- 3 Chang TJ, Tsai MH, Jiang YD a kol. The Arg16Gly polymorphism of human β_2 -adrenoceptor is associated with type 2 diabetes in Taiwanese people. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;57:685–690.
- 4 Duarte NL, Colagiuri S, Palu T, Wang XL, Wilcken DE. Obesity, type II diabetes and the β_2 adrenoceptor gene Gln27Glu polymorphism in the Tongan population. *Clin Sci (Lond)* 2003;104:211–215.
- 5 Echwald SM, Sorensen TI, Tybjaerg-Hansen A, Andersen T, Pedersen O. Gln27Glu variant of the human β_2 -adrenoceptor gene is not associated with early-onset obesity in Danish men. *Diabetes* 1998;47:1657–1658.
- 6 Ehrenborg E, Skogsberg J, Ruotolo G a kol. The Q/E27 polymorphism in the 2-adrenoceptor gene is associated with increased body weight and dyslipoproteinaemia involving triglyceride-rich lipoproteins. *J Intern Med* 2000;247:651–656.

- 7 Galletti F, Iacone R, Ragone E a kol. Lack of association between polymorphism in the β 2-adrenergic receptor gene, hypertension, and obesity in the Olivetti Heart Study. *Am J Hypertens* 2004;17:718–720.
- 8 Garenc C, Perusse L, Chagnon YC a kol. Effects of β 2-adrenergic receptor gene variants on adiposity: the HERITAGE Family Study. *Obes Res* 2003;11:612–618.
- 9 Gonzalez Sanchez JL, Proenza AM, Martinez Larrad MT a kol. The glutamine 27 glutamic acid polymorphism of the β 2-adrenoceptor gene is associated with abdominal obesity and greater risk of impaired glucose tolerance in men but not in women: a population-based study in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;59:476–481.
- 10 Hayakawa T, Nagai Y, Kahara T a kol. Gln27Glu and Arg16Gly polymorphisms of the β 2-adrenergic receptor gene are not associated with obesity in Japanese men. *Metabolism* 2000;49:1215–1218.
- 11 Hellstrom L, Large V, Reynisdottir S, Wahrenberg H, Arner P. The different effects of a Gln27Glu β 2-adrenoceptor gene polymorphism on obesity in males and in females. *J Intern Med* 1999;245:253–259.
- 12 Ishiyama-Shigemoto S, Yamada K, Yuan X a kol. Association of polymorphisms in the β 2-adrenergic receptor gene with obesity, hypertriglyceridaemia, and diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999;42:98–101.
- 13 Iwamoto N, Ogawa Y, Kajihara S a kol. Gln27Glu β 2-adrenergic receptor variant is associated with hypertriglyceridemia and the development of fatty liver. *Clin Chim Acta* 2001;314:85–91.
- 14 Kato N, Sugiyama T, Morita H a kol. Association analysis of β 2-adrenergic receptor polymorphisms with hypertension in Japanese. *Hypertension* 2001;37:286–292.
- 15 Kim SH, Kim DJ, Seo IA a kol. Significance of β 2-adrenergic receptor gene polymorphism in obesity and type 2 diabetes mellitus in Korean subjects. *Metabolism* 2002;51:833–837.
- 16 Kortner B, Wolf A, Wendt D, Beisiegel U, Evans D. Lack of association between a human β -2 adrenoceptor gene polymorphism (gln27glu) and morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23: 1099–1100.
- 17 Lange LA, Norris JM, Langefeld CD a kol. Association of adipose tissue deposition and β -2 adrenergic receptor variants: the IRAS family study *Int J Obes* 2005;29:449–457.
- 18 Large V, Hellstrom L, Reynisdottir S et al. Human β -2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte β -2 adrenoceptor function. *J Clin Invest* 1997;100:3005–3013.
- 19 Lin RCY, Ericsson JO, Benjafield AV, Morris BJ. Association of β 2-adrenoceptor Gln27Glu variant with body weight but not hypertension. *Am J Hypertens* 2001;14:1201–1204.
- 20 Malczewska-Malec M, Wybranska I, Leszczynska-Golabek I a kol. An analysis of the link between polymorphisms of the β 2 and β 3 adrenergic receptor gene and metabolic parameters among Polish Caucasians with familial obesity. *Med Sci Monit* 2003;9:CR277–CR286.
- 21 Martinez JA, Corbalan MS, Sanchez-Villegas A a kol. Obesity risk is associated with carbohydrate intake in women carrying the Gln27Glu β 2-adrenoceptor polymorphism. *J Nutr* 2003;133:2549–2554.
- 22 Meirhaeghe A, Helbecque N, Cotel D, Amouyel P. Impact of polymorphisms of the human β 2-adrenoceptor gene on obesity in a French population. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:382–387.
- 23 Mori Y, Kim-Motoyama H, Ito Y a kol. The Gln27Glu β 2-adrenergic receptor variant is associated with obesity due to subcutaneous fat accumulation in Japanese men. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258:138–140.
- 24 Oberkofler H, Esterbauer H, Hell E, Krempler F, Patsch W. The Gln27Glu polymorphism in the β 2-adrenergic receptor gene is not associated with morbid obesity in Austrian women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:388–390.
- 25 Phares DA, Halverstadt AA, Shuldiner AR a kol. Association between body fat response to exercise training and multilocus ADR genotypes. *Obes Res* 2004;12:807–815.
- 26 Santos JL, Pérez-Bravo F, Martínez JA a kol. No evidence for an association between genetic polymorphisms of 2- and 3-adrenergic receptor genes with body mass index in Aymara natives from Chile. *Nutrition* 2002;18:255–258.
- 27 Tafel J, Branscheid I, Skwarna B a kol. Variants in the human β 1-, β 2-, and β 3-adrenergic receptor genes are not associated with morbid obesity in children and adolescents. *Diabetes Obes Metab* 2004;6: 452–455.
- 28 van Tilburg JH, Wijmenga C, van Bakel H a kol. Relationship of β 2-adrenergic receptor polymorphism with obesity in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:251–252.

6.3. Studie polymorfizmů SREBF-1 genu

1. Eberle, D., K. Clement, et al. (2004). "SREBF-1 gene polymorphisms are associated with obesity and type 2 diabetes in French obese and diabetic cohorts." *Diabetes* 53(8): 2153-7.
2. Grarup, N., K. L. Stender-Petersen, et al. (2008). "Association of variants in the sterol regulatory element-binding factor 1 (SREBF1) gene with type 2 diabetes, glycemia, and insulin resistance: a study of 15,734 Danish subjects." *Diabetes* 57(4): 1136-42.
3. Harding, A. H., R. J. Loos, et al. (2006). "Polymorphisms in the gene encoding sterol regulatory element-binding factor-1c are associated with type 2 diabetes." *Diabetologia* 49(11): 2642-8.

7 Přílohy

7.1. Dotazník

Jméno, příjmení	[redacted]	Číslo DNA odběrky	T 77
Rodné číslo	[redacted]		
Datum			
Výška	101 cm		
Váha	70-75 101,5 kg		
BMI	39,2 kg/m ²		
pás	104,4	uprostřed mezi dolními žebry a horní okrajem pánve	
L4-L5	112,9	ve výšce obratle L4-5, většinou výška pupku	
boky	124,4	přední horní trny lopatky pánevní	
hýždě	123,2	vrchol hýždí při stoji spatném	
WHR	0,87	nejušší místo na trupu (od pupku nahoru) pás nebo L4-L5 / nejširší (od pupku dolů) hýždě nebo boky	
PDK třísko	64,4		
PDK nad kolenem	52,4	PDK - pravá dolní končetina	
PDK lýtko	46,4	LDK - levá dolní končetina	
LDK třísko	68,9	nejširší obvod stehna	
LDK nad kolenem	51,1	nejširší obvod nad kolenem (začátek quadriceps femoris)	
LDK lýtko	45,8	nejširší obvod lýtky (většinou horní 1/3, ev. /2	
Bodystat číslo			
tuk %	21-27 45,8		
tuk kg	15-20 46,5		
akt. hmot. %	73-79 54,2	svaly + kosti	
akt. hmot. Kg	53-58 55		
voda %	50-60 40,8		
voda l	51-61 41,4		
bazální met. kJ/d	7326	energie nezbytná pro základní životní funkce organismu	
kJ/kg/d	72,2		
CEV kJ/d	10256	celkový energet. výdej - bazální metabolismus + pohybová aktivita 4. úrovně	
impedance	443		

Jméno a příjmení

Rodné číslo

Datum

e-mail

Dlouhodobé návyky

Druh

Množství:

Cigarety

Alkohol

Káva

Štitná žláza

Od kdy / kdo:

Od kdy:

Veškeré užívané medikamenty:

Dosud nevyšetřována

Funkce normální – poslední vyš. ve věku:

Snižená funkce

Zvýšená funkce

Sledování lékařem – bez terapie

Obtěžuje se štítníci u blízkých příbuzných

Nádor

Uzly

Zánět

Protilátky

Zvětšená

Zmenšená

ANTIDEPRESIVA OD 2002-1
(ZOLOFT OD 2006)

NORETISTERON OD 2005,
OD 2002? HORMONOTH. PRO
METROPOLITAN, VYSAZENO PRO
HYPERTENZI

OD 10/08 GLAUKOM

Udělejte čárku do šedé linky (představuje 0-100%) dle Vašeho pocitu míry intenzity / častosti

Vzor:

0% nikdy

Zimomřivost

Trvale 100%

0% nikdy

Zimomřivost

Trvale 100%

0% nikdy

Pohotové, odpovídající, vtipné, přesné, rychlé tempo myšlení

Vždy 100%

0% nikdy

Únava

Trvalá 100%

0% v žádném případě

Mé kg a postava jsou logický důsledek mé životosprávy

Ano, mohu si za to sám(a) 100%

0% nikdy

Omezování se ve stravě

Při každém denním jídle 100%

0% nikdy

Přejedení se

Denně 100%

0% nikdy

Pocity hladu

Denně 100%

0% nikdy

Chutě sníst více jídla než jíte

Při každém jídle 100%

0% méně než 3h/d

Sezení

Více než 12 h/d 100%

0% ne více než 1h / týden

Sport – pohybová aktivita

Více než 2h / den 100%

0% nikdy

Bolesti kloubů

Trvale 100%

0% nikdy žádný neht zlomený

Lomivost nehtů

Trvale alespoň 1 nehet je zlomený / rozštěpený 100%

0% špatná (lomivé, třepivé, tenké) trvale

Kvalita vlasů

(pevné, silné, netepí se) 100%

0% dosud jsem se vůbec nesnažil

Vynaložená snaha o redukci hmotnosti / formování postavy

Trvale zkouším a dodržuji vše, co se dá 100%

0% nikdy

Depresivita, pesimismus, špatná nálada

Trvale 100%

0% nikdy

Akne

Trvale 100%

0% nikdy

Nepravidelná menstruace

Trvale nepravidelnosti v pauzách / trvání / síle 100%

0% téměř hluchota

Sluch

Lepší než ostatní lidé, výborný sluch 100%

0% nikdy

Otoky dolních končetin

Trvale denně oteklé nohy 100%

0% žádné

Ochlupení (obličej, nohy, břicho, ruce, jiné)

Mnohem výraznější než u většiny žen, skoro jako muž 100%

0% ani 1 denní jídlo není nikdy pravidelné

Pravidelnost stravy

5 x denně máte trvale pravidelnou stravu 100%

0% nikdy

Zácpy

Trvale 100%

0% nikdy

Pocit zvýšené tělesné teploty °C / pocit nemocnosti

Trvale 100%

0% nevydržím držet žádnou dietu ani 1 den

Držet nízkokalorickou dietu

Bez potíží vydržím i déle než 6 měs. 100%

0% ani usilovné posilování nezpůsobí viditelný nárůst

Svalovina

Stačí trochu cvičení a svaly rostou skoro samy 100%

0% od dětství při zátěži rychlé vyčerpání, svalová únava

Výtrvalost

V mládí velká sportovní vydrž, vytrvalost 100%

0% nikdy mi sprintování nešlo, vždy jsem patřil k nejhorším

Sprintování, vysoký fyzický výkon

Ve sprintu jsem v mládí patřil(a) k nejlepším 100%

0% neurčím pozornost při činnosti déle než 1min.

Soustředění se na duševní činnost

Pozornost, soustředění - i déle než 8h v kuse 100%

0% potíže s učení se nových věcí, nepamatují si pak nic

Učení se, paměť

Vše si hned snadno a dobře trvale pamatují 100%

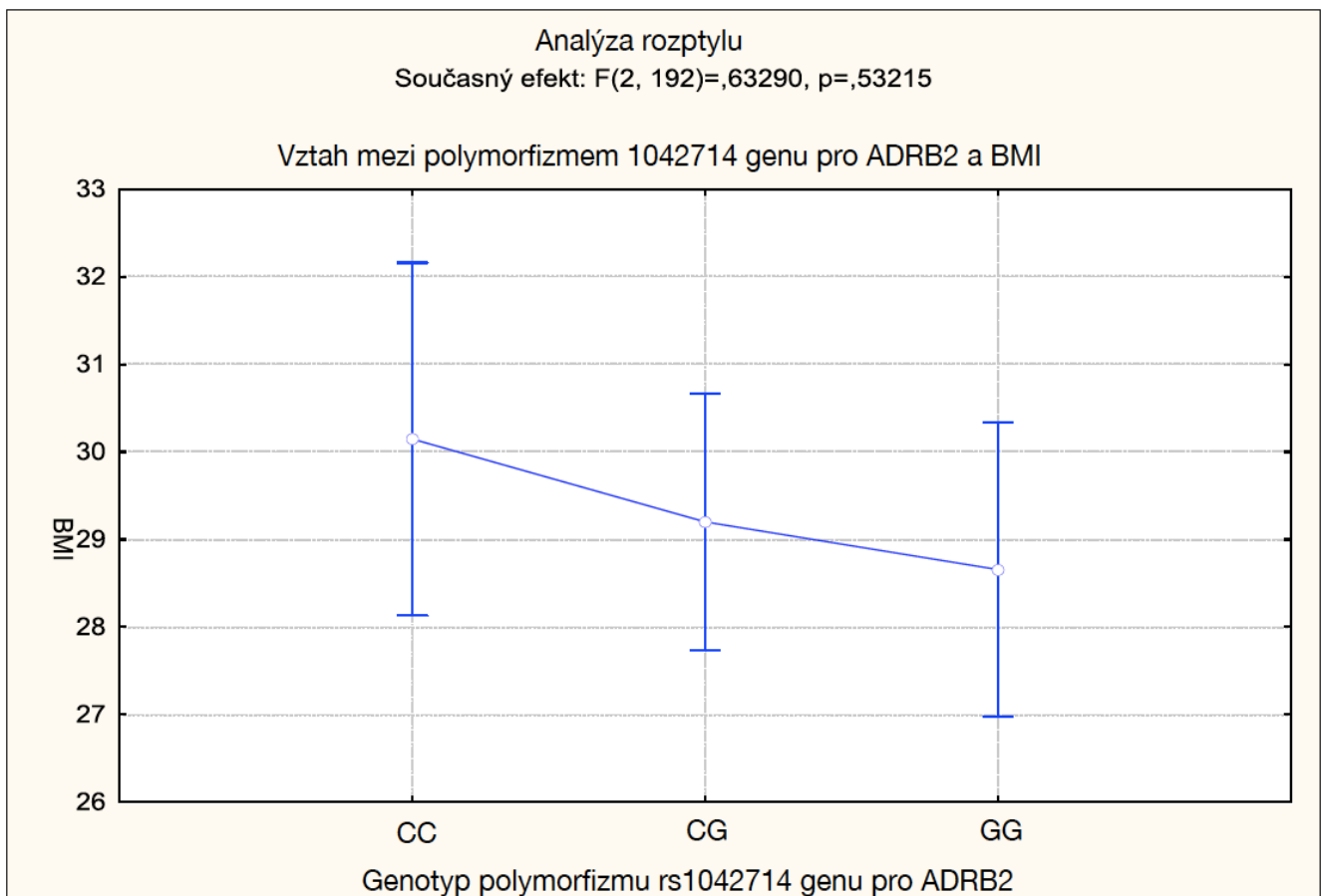
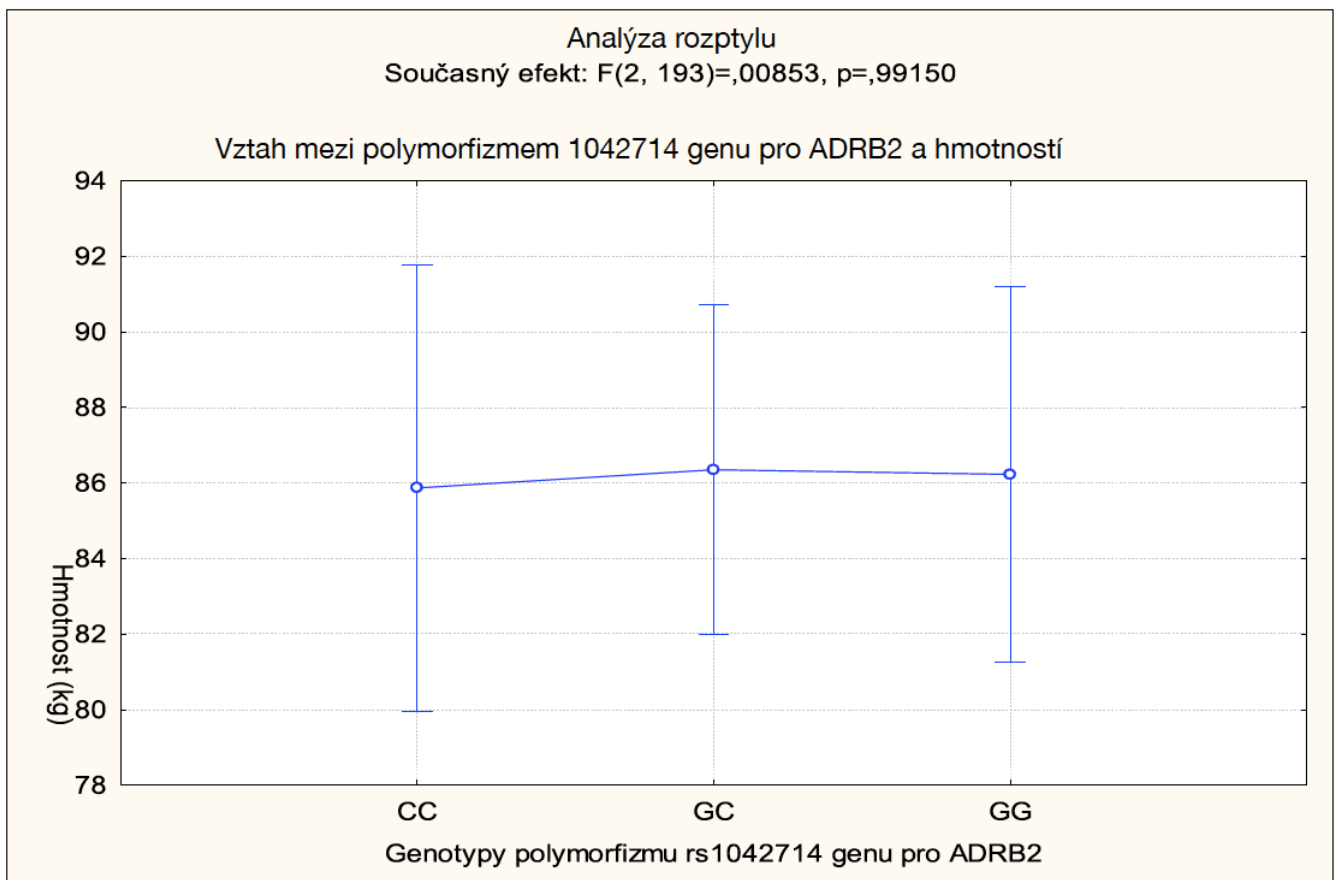
0% do 35 let pevná, dobře se hojí, bez pigmentací a vrásek

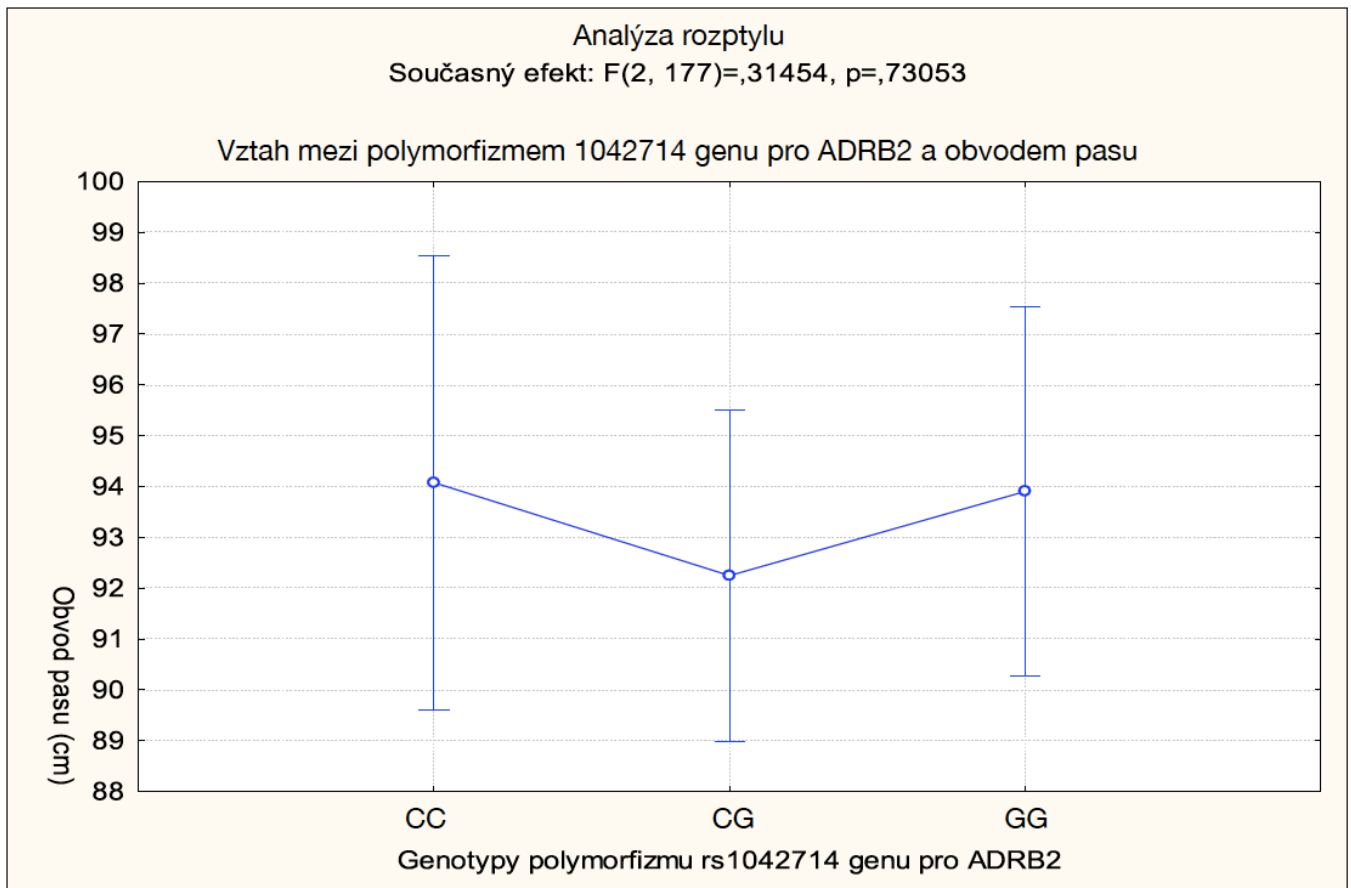
Pokožka

Špatné hojení, vrásky a pihy, skvrny a rozvolnění od mládí 100%

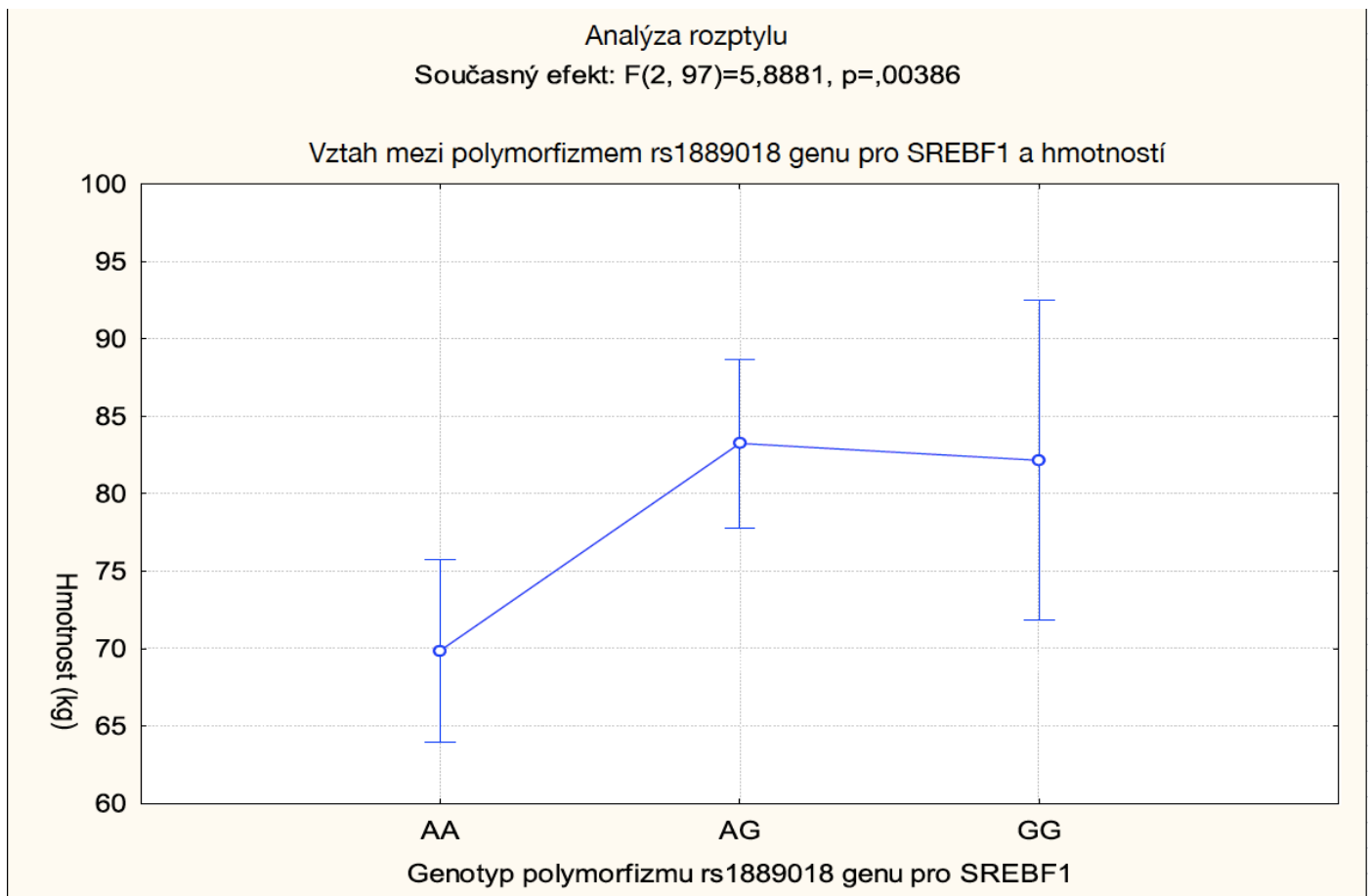
7.2. ANOVA

7.2.1. ADRB2





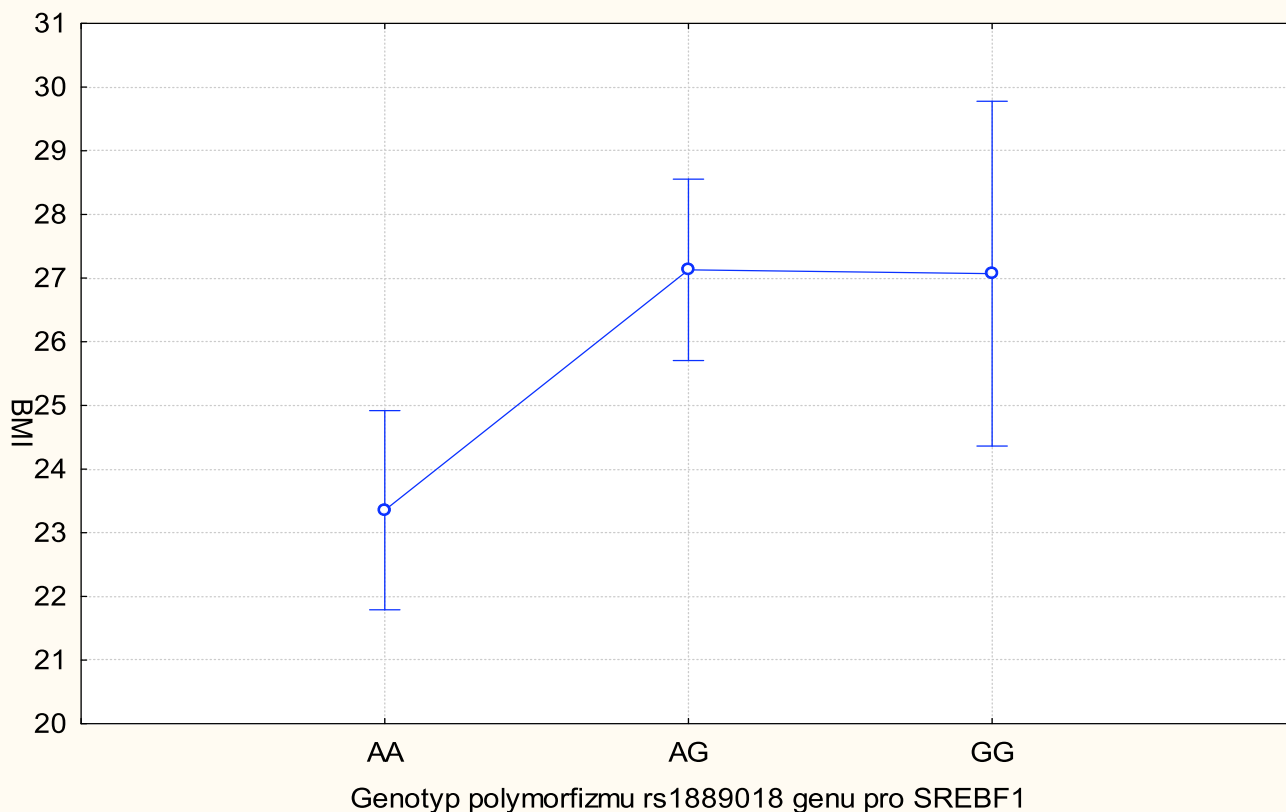
7.2.2. SREBF-1



Analýza rozptylu

Současný efekt: $F(2, 96)=6,9169, p=,00156$

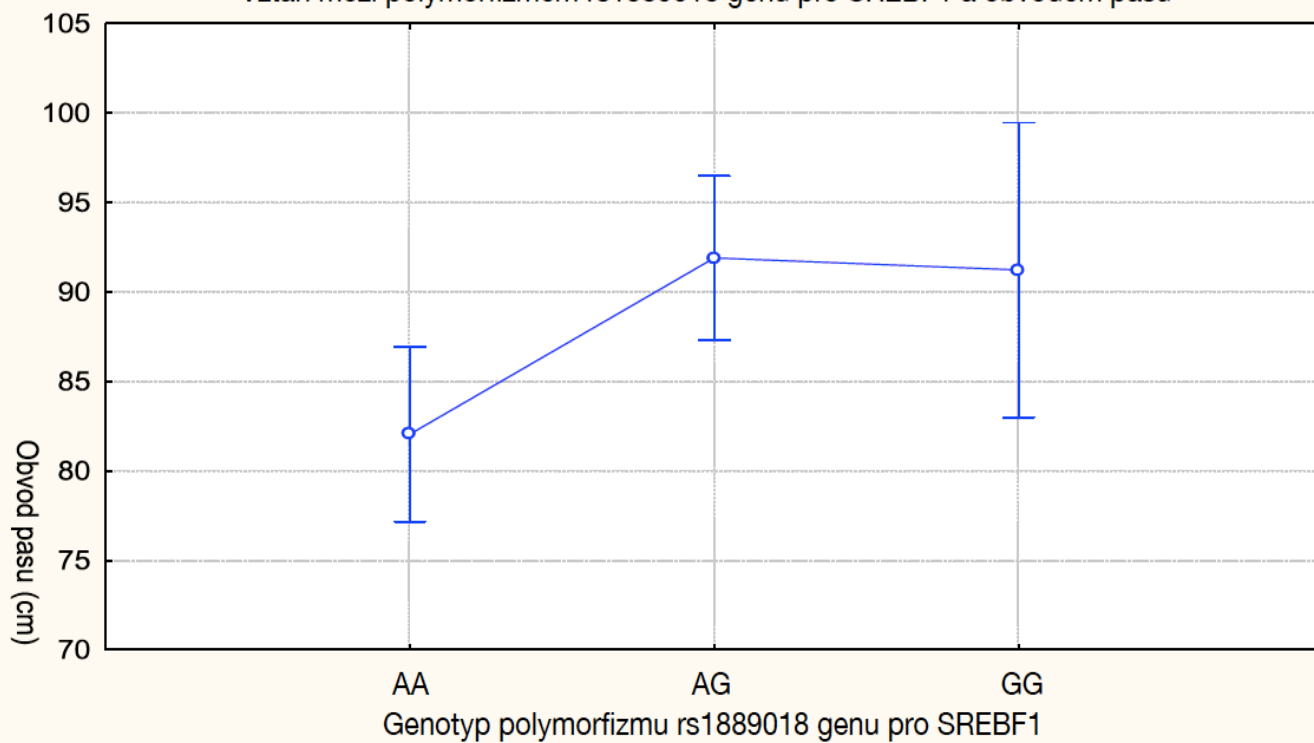
Vztah mezi polymorfizmem rs1889018 genu pro SREBF1 a BMI



Analýza rozptylu

Současný efekt: $F(2, 89)=4,6629, p=,01186$

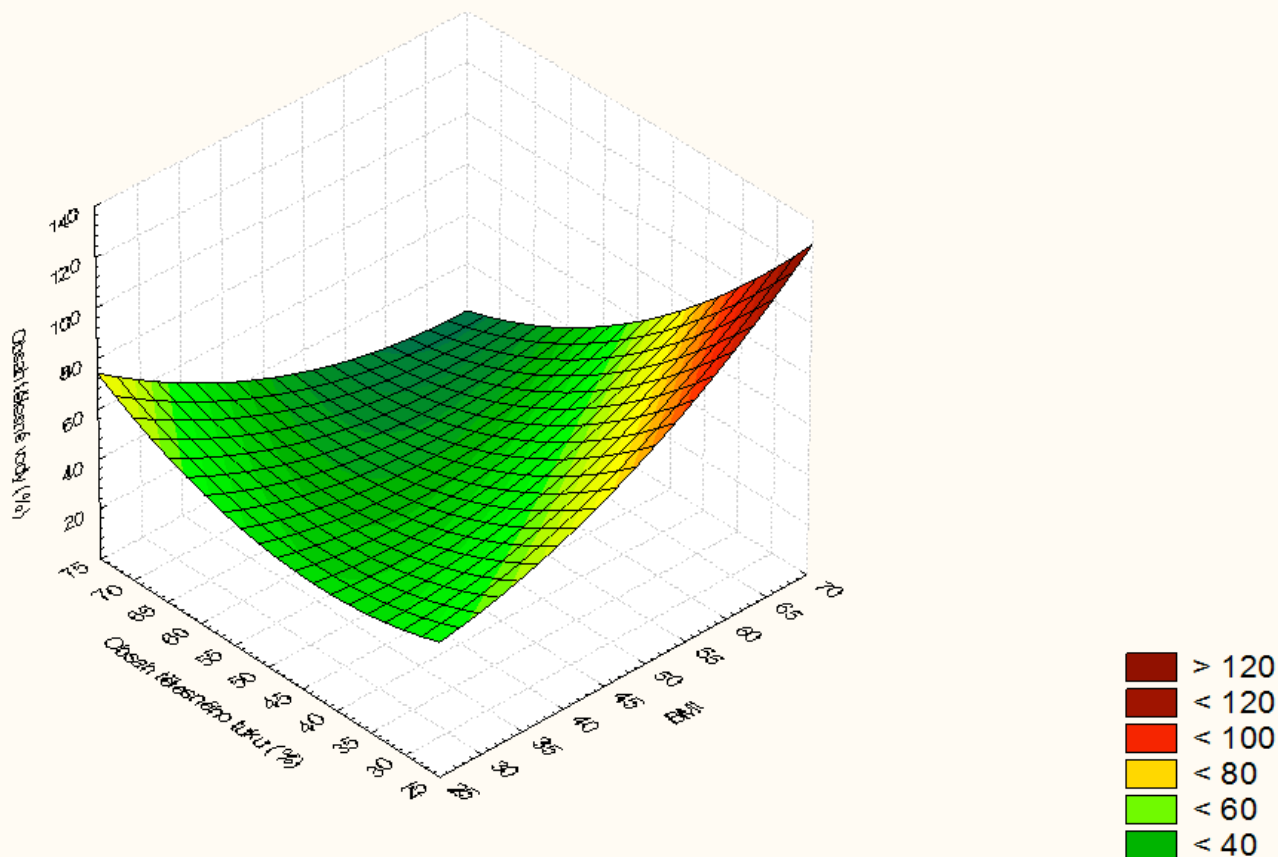
Vztah mezi polymorfizmem rs1889018 genu pro SREBF1 a obvodem pasu



7.3. 3D povrchové grafy

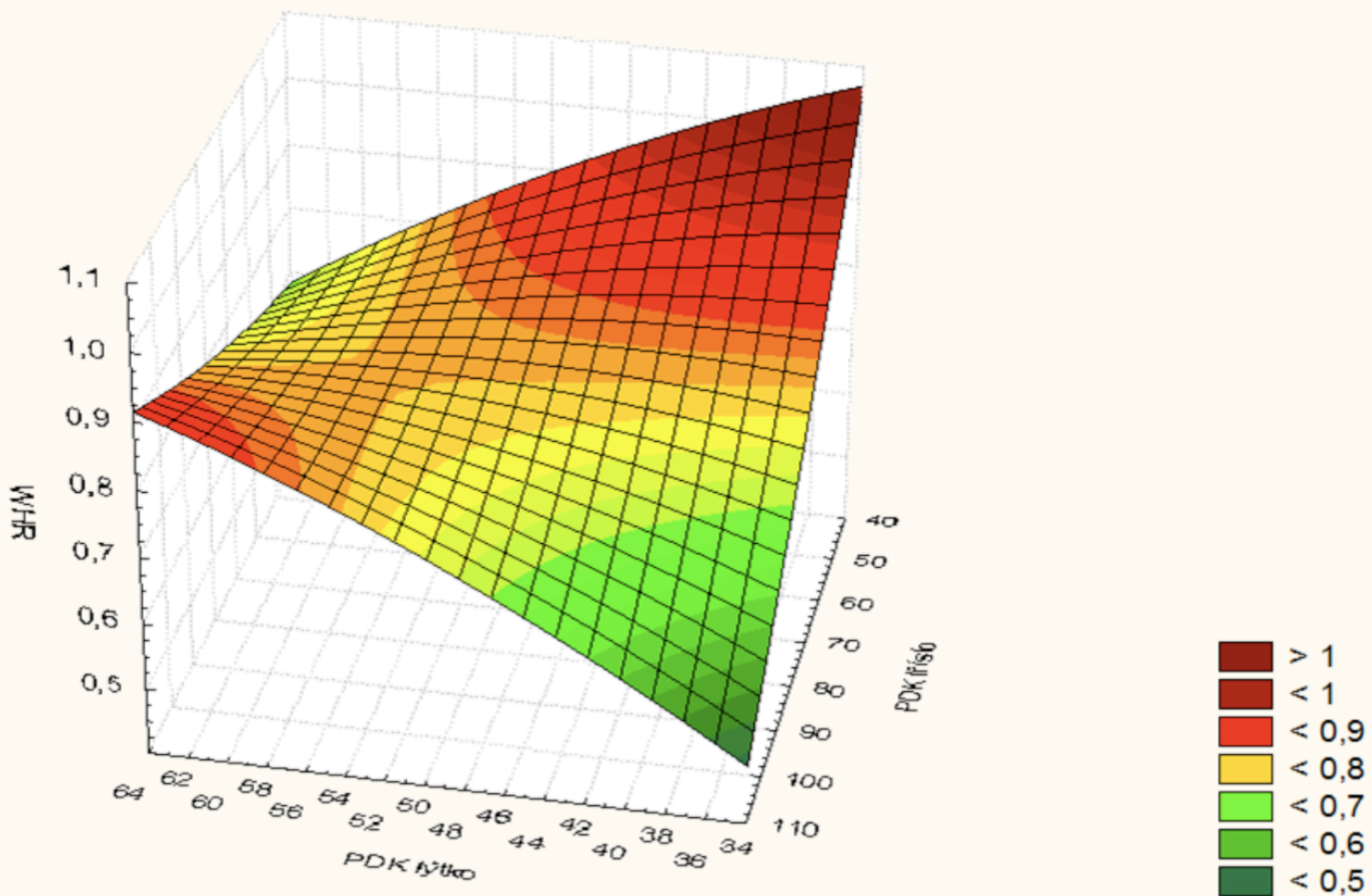
3D Povrchový graf z Prom24 proti Prom9 a Prom20
Obezita A10032009.sta 47v*218c

Vzájemný vztah mezi BMI, celkovým obsahem vody a tuku v těle



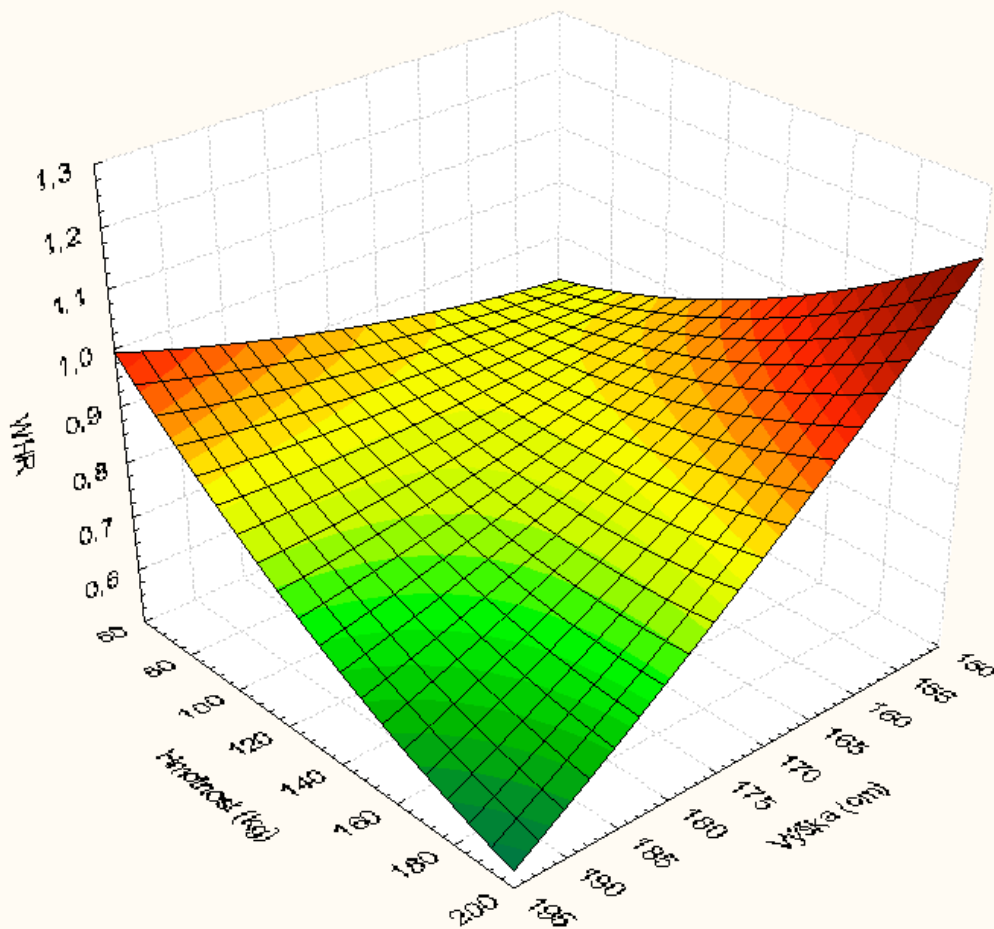
3D Povrchový graf z Prom13 proti Prom16 a Prom14
Obezita A10032009.sta 47v*218c

Vzájemný vztah mezi PDK třísko, WHR a PDK lýtko



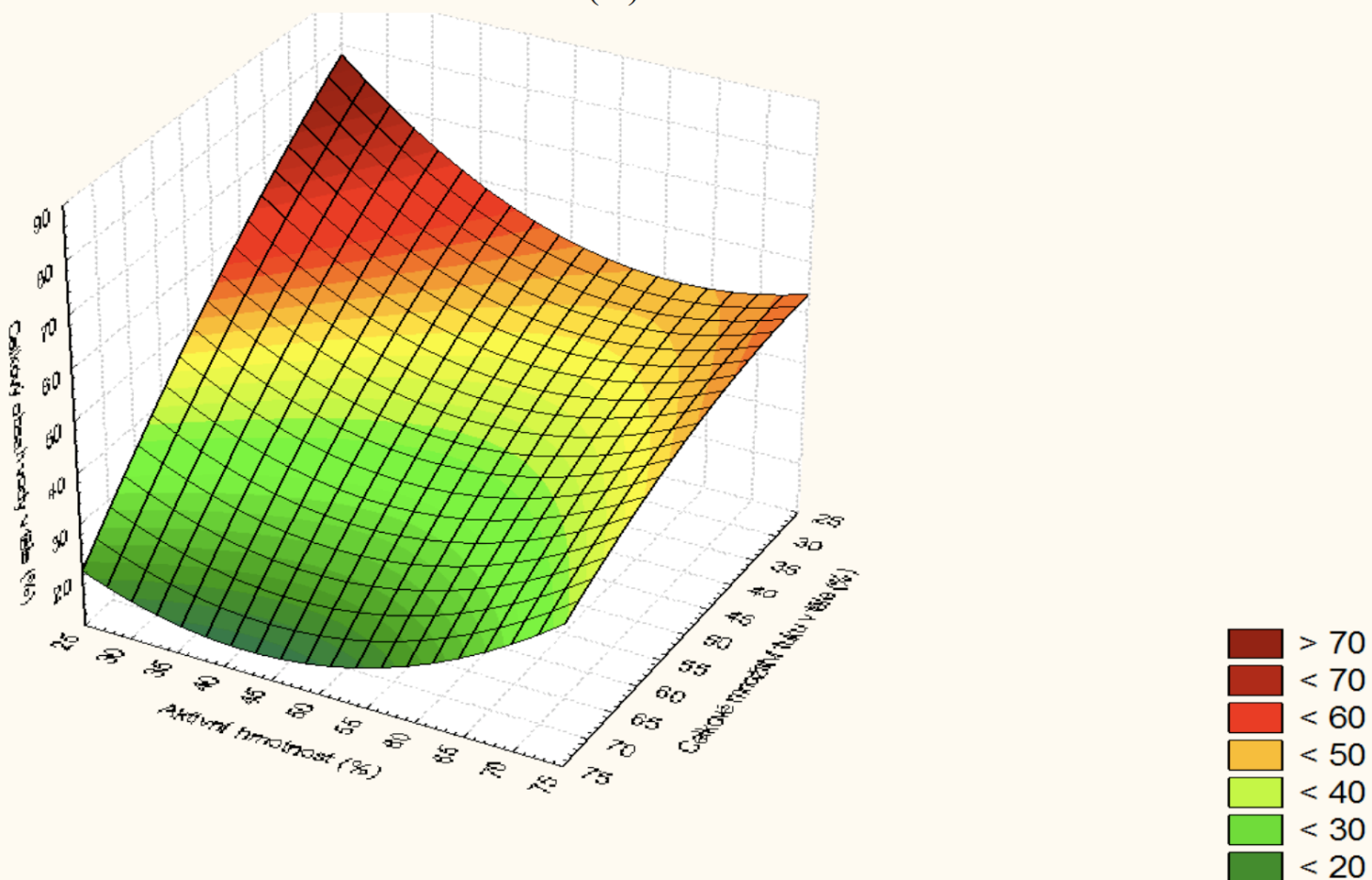
3D Povrchový graf z Prom13 proti Prom5 a Prom6
Obezita A10032009.sta 47v*218c

Vztah mezi výškou, hmotností a WHR (poměr pas/boky)

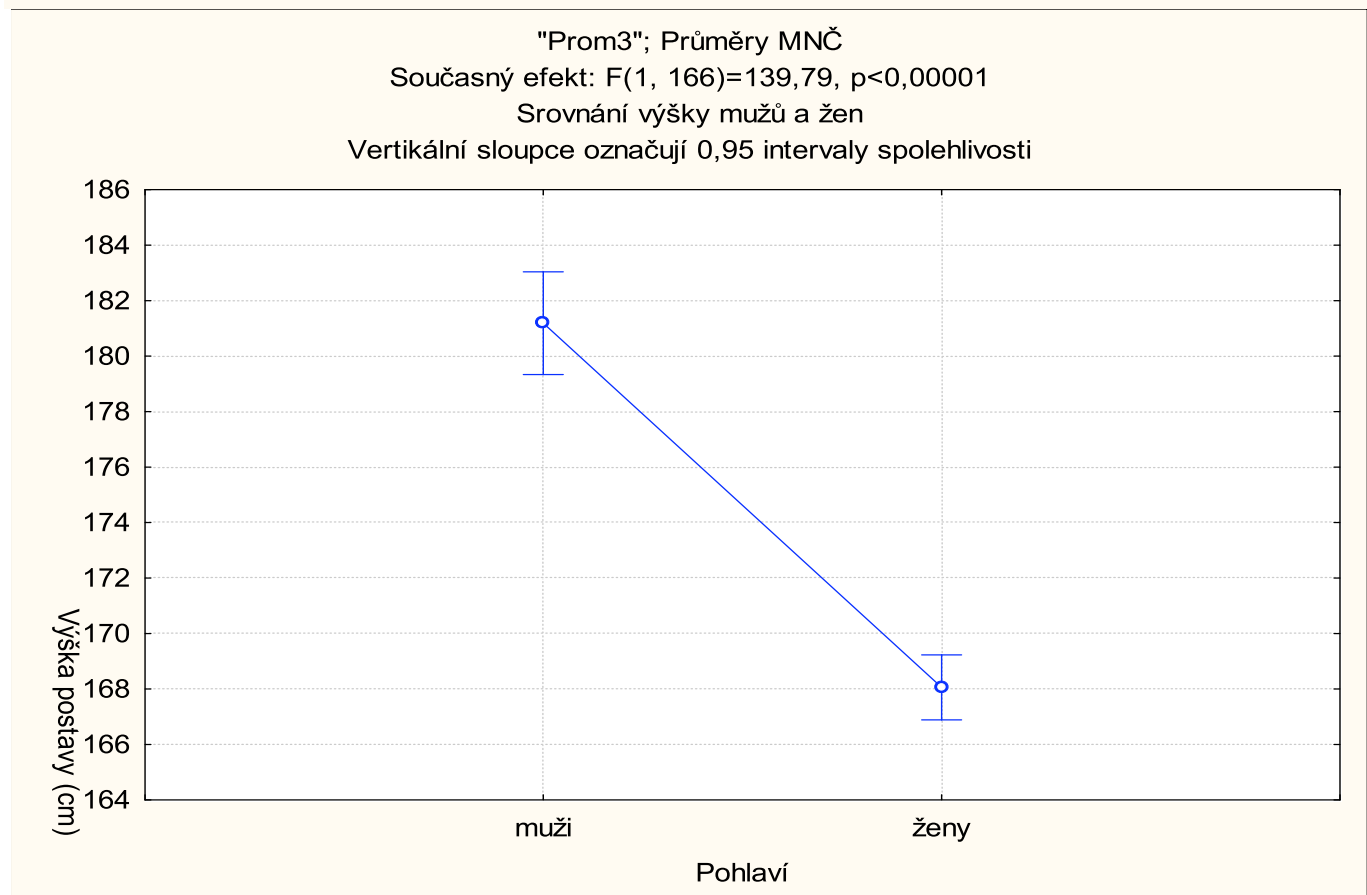
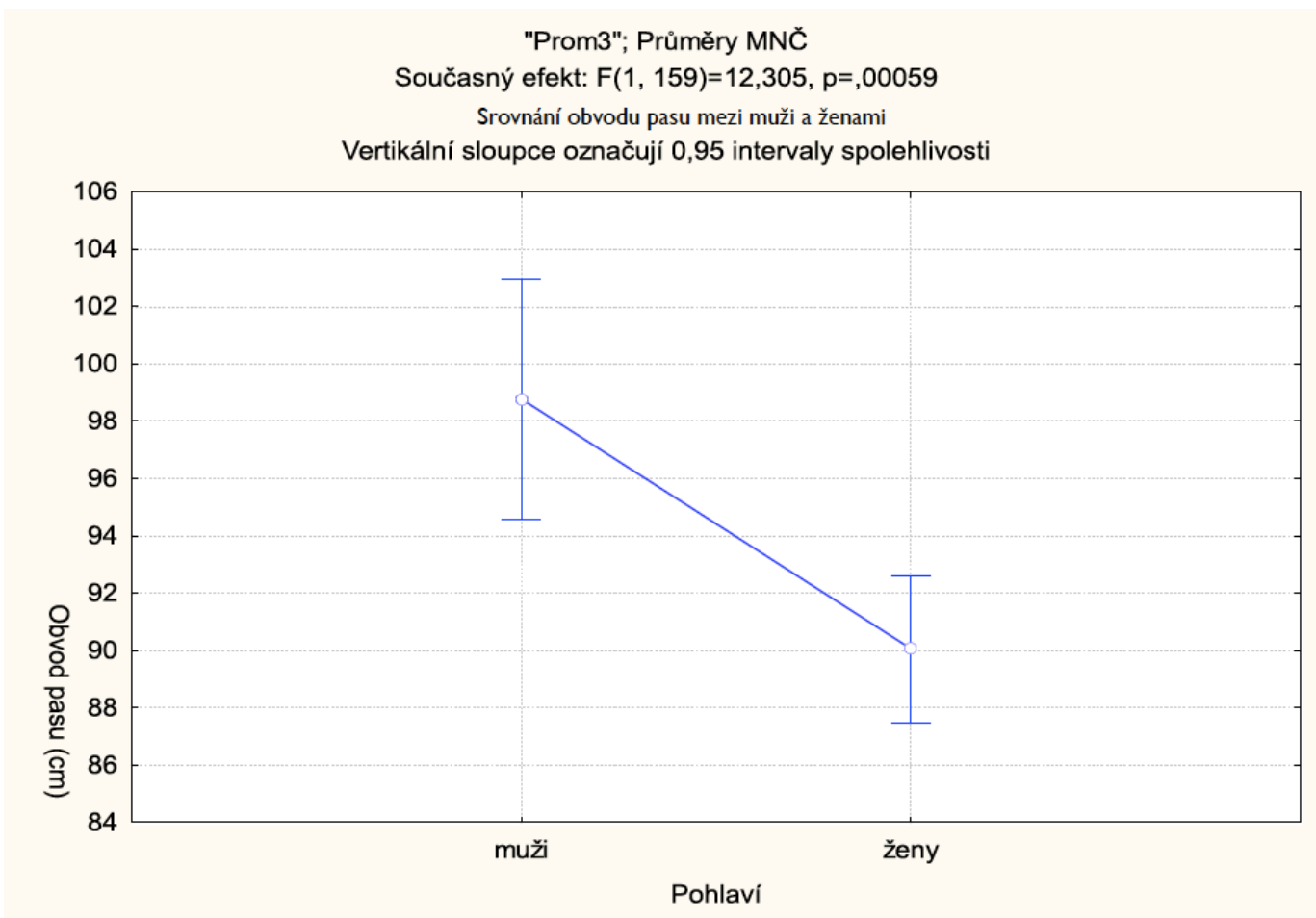


3D Povrchový graf z Prom24 proti Prom20 a Prom22
Obezita A10032009.sta 47v*218c

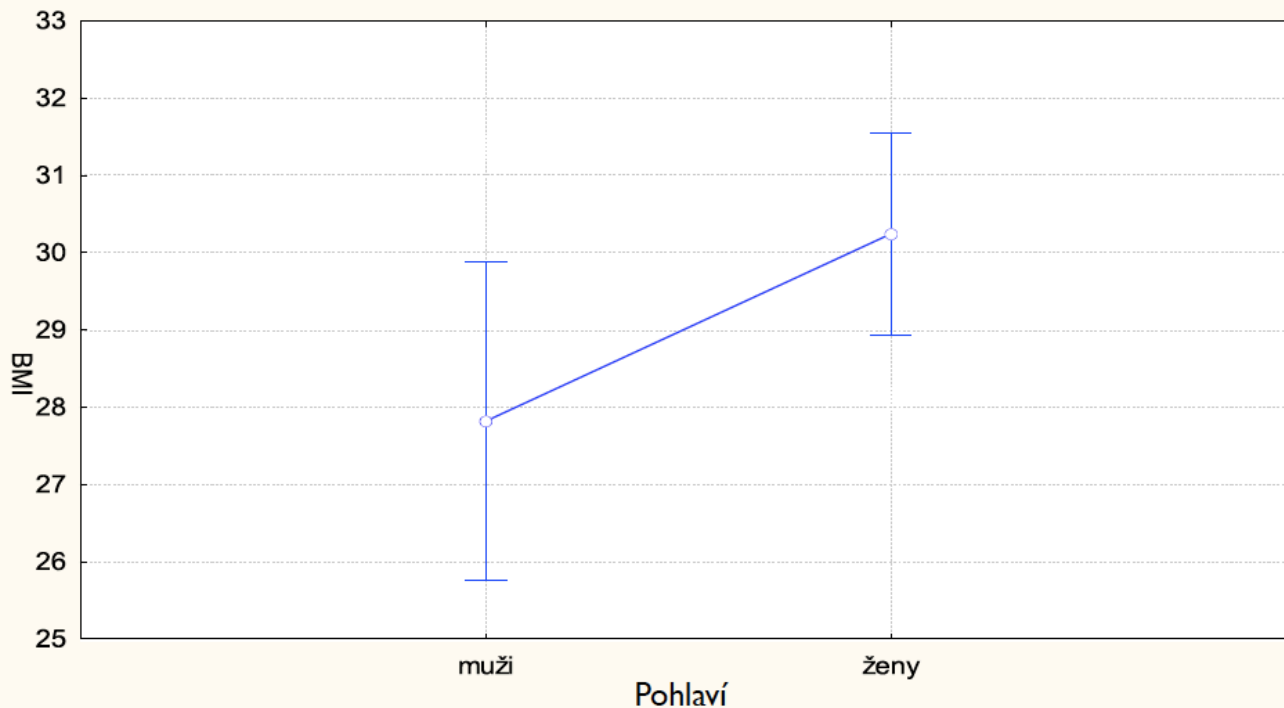
Vzájemný vztah mezi množstvím tuku v těle (%), vody (%) a
aktivní hmotností (%)



7.4. Srovnávání hodnot muži vs. ženy



"Prom3"; Průměry MNČ
 Současný efekt: $F(1, 166)=3,8330, p=,05193$
 Srovnání BMI mezi muži a ženami
 Vertikální sloupce označují 0,95 intervaly spolehlivosti



7.5. Izolační kit UltraClean™ Blood Spin DNA

Izolace 250ml vzorků DNA

Component	Amount	Description
Proteinase K	6.25mg	Proteinase K
Solution B1	11 ml	Guanidine HCl/Tween solution
Solution B2	11 ml	100% Ethanol
Solution B3	27.5 ml	Ethanol/Guanidine HCl solution
Solution B4	30 ml	Ethanol, Tris, NaCl.
Solution B5	11 ml	10 mM Tris-HCl.