



UNIVERZITA KARLOVA
I. lékařská fakulta

Studijní obor: Výživa dospělých a dětí

Bc. Pham Khanh Ha

Polymorfismy nutrigeneticky funkčních genů v české a vietnamské populaci

Polymorphisms of the nutrigenetics-active genes in Czech and Vietnamese
population

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. Ing. Jaroslav Hubáček, CSc., DSc.

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literatury. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím/~~Nesouhlasím~~ s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 25.04.2023

Khanh Ha Pham

.....

Podpis

Identifikační záznam

PHAM, Khanh Ha. Polymorfismy nutrigeneticky funkčních genů v české a vietnamské populaci. [Polymorphisms of the nutrigenetics-active genes in Czech and Vietnamese population]. Praha, 2023. 63 s., 3 příl. Diplomová práce (Mgr.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 3. interní klinika VFN a 1. LF UK v Praze. Vedoucí práce Doc. Ing. Jaroslav Hubáček, CSc., DSc.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce zkoumá a porovnává výskyt alel polymorfismů v nutrigeneticky významných genech ve dvou populacích - české a vietnamské.

Teoretická část práce popisuje jednotlivé geny a jejich polymorfismy, které jsou dlouho známy svým vlivem na metabolismus živin či na rozvoj metabolických onemocnění a jiné patologické procesy. Diskutuje o možných příčinách pozitivního výběru a o jeho dopad na dnešní rozložení genotypů a alel daných polymorfismů.

V praktické části jsou uvedeny postupy při získání DNA, metody genetické analýzy polymorfismů včetně PCR-RFLP a real-time PCR spolu se zpracováním frekvenčního potravinového dotazníku. Výsledky analýz a dotazníkového šetření jsou statisticky hodnoceny a prezentovány pomocí tabulek a grafů v sekci Výsledky. V diskuzi se pojednává o možných příčinách daných výstupů.

Výsledky práce ukazují, že zastoupení rizikové alely je nižší ve vietnamské komunitě zejména u polymorfismu v genu FTO predikujícím vznik obezity, v genu TCF7L2 asociovaném s rozvojem diabetes mellitus 2. typu, v genu ADH1B s rizikem možné závislosti na alkoholu a v genu MC6M zodpovědném za laktázovou perzistenci. Srovnatelnou frekvenci výskytu alel lze najít v polymorfismu genu MC4R, genu HFE a genu ApoE. Uvedené nálezy rovněž souhlasí s výsledky plynoucími z dotazníkového šetření, které ukazují na nižší spotřebu alkoholu a mléka u vietnamské menšiny.

Tato práce by mohla být svým zaměřením a tématem jedinečná a mohla mít přínos zejména pro vietnamskou komunitu žijící v České republice. Výsledky práce by mohly sloužit jako podklad k vytvoření jídelního plánu specifického pro Vietnamce nejen v prevenci vzniku onemocnění ale i v terapii již rozvinutých patologických stavů zejména s přihlédnutím ke genetickým predispozicím vyplývajícím z této práce.

Klíčová slova: SNP, polymorfismy, nutrigenetika, genetická analýza, výživa

ABSTRACT

This Master's thesis analyzes and compares the allele distribution of some polymorphisms within nutrigenetics-active genes in the Czech and Vietnamese population.

The theoretic part of this thesis describes the genes along with their polymorphisms that can contribute to the metabolism of some nutrients or which are long known for their association with the onset and manifestation of some metabolic diseases and other pathologic processes. It also discusses the possible causes of positive selection and its impact on the allele and genotype frequency of said polymorphisms.

The own research is composed of the processes of DNA obtaining and extraction, genetic analysis' methods including PCR-RFLP and Realtime PCR along with the food frequency questionnaire (FFQ) method. Results of the analyses and questionnaire are statistically evaluated and presented with the aid of tables and graphs. The discussion brings some possible causes for said outcomes.

The results show that the distribution of the risk alleles of observed polymorphisms are usually lower in the Vietnamese community than it is in the Czech population especially within: the FTO gene which can predict the development of obesity, the CTF7L2 gene which is associated with type 2 diabetes, in ADH1B which can regulate alcohol consumption and lastly within the MCM6 gene responsible for lactase persistence. Comparable allele distributions can be found in polymorphisms of the MC4R gene, the HFE gene and the ApoE gene. Presented results also correlate with the findings in the FFQ, where it is noticeable that the Vietnamese community consumes less alcohol and milk products than the major population of Czech.

This thesis could be the first one in its focus and theme and could benefit especially the Vietnamese community living in Czech republic. The results of this thesis could serve as a tool for food recommendations and guidelines making which are targeted specifically for Vietnamese not only in disease prevention but also in the therapy of already developed pathological states especially according to the genetic predispositions found in this study.

Keywords: SNPs, polymorphisms, nutrigenetics, genetic analysis, nutrition

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu práce Doc. Ing. Jaroslavu Hubáčkovi, CSc., DSc., za jeho odborné vedení, rady, připomínky, trpělivost, obrovskou ochotu a vstřícnost během celého zpracování mé práce. Děkuji také všem v laboratoři pro výzkum aterosklerózy IKEM, konkrétně paní Radce Kramné, RNDr. Daně Dlouhé, PhD., a především paní Janě Mesányové za jejich pomoc, rady a ochotu ale také za jejich pozitivní přístup během celé laboratorní části mé práce. Dále bych chtěla vyjádřit vděčnost všem dobrovolníkům a respondentům, kteří souhlasili s účastí ve výzkumu. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich trpělivost, podporu a lásku.

Obsah

1.	Úvod	10
2.	Genetika, strava a zdraví	12
2.1.1.	Genetická různorodost	12
2.2.	Nutrigenetika a nutrigenomika	13
2.3.	Metabolické civilizační onemocnění	15
2.3.1.	Obezita	15
2.3.2.	Diabetes mellitus 2. typu	16
2.3.3.	Kardiovaskulární onemocnění	17
3.	Nutrigeneticky funkční geny a jejich polymorfismy	18
3.1.	Gen FTO a jeho polymorfismy	18
3.2.	Gen TCF7L2	19
3.2.1.	Gen TCF7L2 a jeho polymorfismy	19
3.2.2.	Role TCF7L2 v metabolismu glukózy a lipidů:	21
3.3.	Gen MC4R	21
3.3.1.	Význam melanokortinových receptorů	21
3.3.2.	Gen MC4R a jeho polymorfismy	22
3.4.	Gen ApoE	23
3.4.1.	Apolipoprotein E	23
3.4.2.	Gen ApoE a jeho polymorfismy	23
3.5.	Gen LCT a laktózová intolerance	24
3.5.1.	Laktóza	24
3.5.2.	Laktózová intolerance a laktázová perzistence	25
3.5.3.	Polymorfismus pro laktózovou intoleranci/laktázovou perzistenci	25
3.6.	Gen ADH1B a konzumace alkoholu	26
3.6.1.	Alkohol	26
3.6.2.	Metabolismus alkoholu	27
3.6.3.	Gen ADH1B a jeho polymorfismy	27
3.7.	Gen HFE a hereditární hemochromatóza	29
3.7.1.	Metabolismus železa	29
3.7.2.	Gen HFE a jeho polymorfismy	29
3.7.3.	Hereditární hemochromatóza	31
4.	Praktická část	32
4.1.	Design studie	32

4.2.	Hypotézy.....	32
4.3.	Cíle	32
4.4.	Výzkumný soubor	32
4.5.	Sběr dat.....	33
4.5.1.	Česká populace.....	33
4.5.2.	Vietnamská populace v České republice	33
4.6.	Bukální stěr.....	33
4.7.	Izolace DNA	33
4.8.	Kontrola produktů izolace	35
4.8.1.	Gelová agarózová elektroforéza	35
4.8.2.	Spektrofotometrická kontrola DNA na nanodropu	36
4.8.3.	Výsledek kontroly.....	36
4.9.	Analýza SNPs.....	37
4.9.1.	Metoda PCR	37
4.9.2.	Kontrola produktů PCR.....	40
4.9.3.	RFLP – restrikční štěpení produktů.....	40
4.9.4.	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu.....	40
4.9.5.	Real-time PCR pro gen ApoE.....	43
4.10.	Statistické zpracování dat	45
4.10.1.	Hardy-Weinbergova rovnováha.....	45
4.10.2.	Chi-kvadrát (X^2) test nezávislosti	45
5.	Výsledky.....	46
5.1.	Úspěšnost genotypizace.....	46
5.2.	Hardy-Weinbergova rovnováha	46
5.3.	Frekvence genotypů.....	47
5.3.1.	Frekvence genotypů varianty rs17817449	47
5.3.2.	Frekvence genotypů varianty rs7903146	48
5.3.3.	Frekvence genotypů varianty rs17782313	49
5.3.4.	Frekvence genotypů varianty rs1229984	49
5.3.5.	Frekvence genotypů varianty rs1799945	50
5.3.6.	Frekvence genotypů varianty rs1800562	51
5.3.7.	Frekvence genotypů varianty rs4988235	52
5.3.8.	Frekvence genotypů v genu ApoE (variant rs7412 a rs249358).....	53
5.4.	Dotazníkové šetření	54
5.4.1.	Charakteristiky skupin respondentů.....	54

5.4.2.	Výskyt metabolických civilizačních onemocnění	55
5.4.3.	Frekvence konzumace mléčných výrobků.....	56
5.4.4.	Spotřeba alkoholu.....	57
6.	Diskuse	58
6.1.	Laktózová intolerance	58
6.2.	Vliv genových polymorfismů na konzumaci alkoholu	59
6.3.	Diabetes mellitus 2. typu	60
6.4.	Obezita.....	60
6.5.	ApoE a cholesterolémie.....	61
6.6.	Hereditární hemochromatóza	62
6.7.	Limitace	62
7.	Závěr	63
8.	Seznam použité literatury	64

Seznam zkratk

Seznam grafů

Seznam tabulek

Seznam obrázků

Seznam příloh

1. Úvod

Zdraví jedince je odrazem mnoha ovlivnitelných a neovlivnitelných faktorů vnějších i vnitřních, jedním z nich je i genetika. Není vždy jednoduché říct, do jaké míry je jaká choroba ovlivněna genetickými vlohami, ze studií dvojčat však víme, že je to důležitý determinant zdraví. Role genetiky ve výskytu různých onemocnění spočívá i v tom, jak daný organismus reaguje na změny ve stravování, na změny prostředí, změny pohybového režimu, tedy celkově na jiný životní styl. Civilizační onemocnění jsou v posledních dekádách velkou hrozbou jak v industriálních, tak i v méně rozvinutých zemích. Mezi různými etniky však najdeme některé rozdíly v manifestaci těchto chorob, což mě přivádí k otázce, v čem se liší podmínky, za kterých se tato onemocnění u jednotlivých etnik objevují.

Civilizační choroby, mezi něž patří například diabetes mellitus 2. typu, obezita, dyslipidémie atd., jsou nejen hlavními rizikovými faktory zvýšené morbidity a mortality obyvatelstva, ale představují také značnou ekonomickou zátěž pro mnohé státy a v neposlední řadě personální zátěž na zdravotnická zařízení. Přes veškeré snahy WHO a jiných zdravotnických organizací ve spolupráci se státními mocemi, ale i se zdravotníky v edukaci, osvětě a propagaci zdravého způsobu života, jsou civilizační choroby stále jednou z největších hrozeb 21. století.

Již dlouho se ví, že každý jedinec reaguje na jeho zevní životní podmínky, stejně jako na stravu, životní režim, pohybovou aktivitu jinak. Prvním krokem k vhodnějším výživovým doporučením musí být doporučení s přihlédnutím k mezeitnickým rozdílům a až pak můžeme začít přemýšlet o individuálním doporučení vhodném pro každého vzhledem k jeho genetické výbavě.

Pochopení způsobu interakce mezi různými variantami a stravou nám může pomoci nejen v prevenci komplikací již rozvinutých metabolických chorob, ale i v prevenci jejich manifestace. Některé genotypy variant vedou k větší zranitelnosti k rozvoji těchto onemocnění a frekvence těchto genotypů se mohou v jednotlivé populaci lišit.

Tato diplomová práce je volným pokračováním mé bakalářské práce s názvem „Porovnávání stravovacích návyků mezi českou a vietnamskou populací“. Má za cíl zkoumat rozdíly ve frekvenci výskytu genotypů a alel některých variant nutrigeneticky významných genů mezi populací českou a vietnamskou. Přestože existuje řada významných studií s velkým počtem objektů, nezaznamenala jsem práci porovnávající přímo vietnamskou a českou populaci v tomto směru.

V teoretické části práce je stručně představen význam nutrigenetiky a její vliv na zdraví či morbiditu v populacích, dále bude text zaměřen na vybrané geny, jež vykazují nejsilnější asociaci s některými metabolickými civilizačními chorobami a jinými rizikovými stavy.

Praktická část se věnuje analýze a hodnocení frekvence jednotlivých polymorfismů vyskytujících se v populaci české a vietnamské. Analýzy jsou provedeny na vzorcích odebraných stěrem bukální sliznice dobrovolníků vietnamské národnosti. Výsledky analýz populace české jsou poskytnuty z databáze laboratoře Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) a z dat získaných v projektu post-MONICA. Součástí praktické části práce je také hodnocení stravovacích návyků dobrovolníků vietnamského původu vztahujících především k výsledkům genetické analýzy prostřednictvím dotazníkového šetření.

2. Genetika, strava a zdraví

2.1.1. Genetická různorodost

Je známo, že 99,9 % bází lidského genomu je identických a ve zbylých 0,1 % se skrývá jedinečnost každého člověka. Nejčastějším typem rozdílu v genomu mezi jedinci jsou tzv. jednonukleotidové polymorfismy (SNPs), kdy se varianty jednoho genu liší jen v jednom nukleotidu na stejném místě. Pokud je frekvence jedné varianty v populaci $> 1 \%$, jedná se o polymorfismus, v opačném případě (frekvence $< 1 \%$), jde o mutaci. SNPs bývají ve většině případů bíalelické (vzácněji se ale vyskytují i tri- a tetraalelické polymorfismy). Fenotypovým výsledkem takového polymorfismu může být změna aktivity konečného produktu daného genu vedoucí buď k jistému zvýhodnění či znevýhodnění jedince oproti ostatním. To, zda se jedná o zvýhodnění nebo znevýhodnění záleží v mnoha případech nejen na způsobu jeho života, ale i na mnoha dalších faktorech vnějších i vnitřních. (Ingman, 2000; Wang, 2007; Bouchard a Ordovas, 2014)

Nejlépe přijímaná hypotéza o původu rodu *Homo sapiens* je hypotéza o afrických kořenech. Po migraci lidí rodu *Homo sapiens* před 100 000 lety z Afriky do zbytku světa se lidský genom značně změnil a rozšířil, různé genetické varianty tak byly vystaveny různým prostředím a také přírodní selekci, která nakonec vyústila v takovou frekvenci výskytu endotypů gpolymorfismů, kterou dnes zaznamenáváme. Tento stav je výsledkem vývoje genetické divergence a adaptace genotypu po mnoha generacích v závislosti na životních podmínkách, životním prostředí včetně podnebí a klimatu, dostupnosti potravy, způsobu života apod. Existují proto rozdíly v genomu nejen mezi jednotlivci, ale i mezi jednotlivými populacemi/etniky, v každé oblasti světa se některé alely mohou vyskytovat v různém poměru. Všechny zmíněné interakce mezi geny a vnějším prostředím pomohly vytvářet například různou pigmentaci kůže, ale i specifický energetický metabolismus a regulaci vodní a minerálové bilance, aby organismus v daném prostředí dokázal hospodařit co nejefektivněji. (Griffiths, 2015; Bouchard a Ordovas, 2014)

Barbujani a kol. (1997) popisují, že zhruba 85 % SNPs je běžných pro celé lidstvo a jen 15 % SNPs je rasově specifických. Projekt International Hapmap Project zkoumal od roku 2002 ve své 1. fázi rozdíly v genetických informacích mezi 3 velkými etnickými skupinami: Afričany, Asiaty (Číňany a Japonci) a Evropany. Coop (2009) s jeho týmem genotypoval 900 000 SNPs u osob z 3 výše zmíněných genetických skupin a našel, že 6955 polymorfismů mezi Asiaty a Afričany se liší, mezi Evropany a Afričany pak v 3500 SNPs, a mezi Asiaty a Evropany v 792 SNPs. Počet polymorfismů, které jsou unikátní pro konkrétní populaci, je však velmi malý. Můžeme říci, že z genetického pohledu jsou Asiati bližší k Evropanům než k Afričanům. (Bouchard a Ordovas, 2014; Altshuler, 2010)

Souvislost mezi geny, zdravím a podnebím či klimatem zkoumali například Hancock a kol. (2008). Objevili souvislost mezi výskytem metabolických chorob s klimatickými podmínkami prostředí. Ve své práci našli mezi 873 SNPs v 82 kandidátních genech pro metabolické regulace u 54 populací z celého světa 33 SNPs v 19 genech, které jsou

spojovány s letním klimatem, a dalších 32 SNPs v 17 genech korelovaných se zimním podnebím, 14 SNPs v 7 genech je pak spojeno se zeměpisnou šířkou. Mnohé z nich také souvisí s metabolismem, nutričním stavem, schopností oxidace, atd. v závislosti na ročním období/klimatických podmínkách. Zejména TCF7L2 varianty asociovány s výskytem DM vykazují jistou asociaci s letními klimatickými podmínkami.

Význam změny životního stylu na zdraví byl také předmětem mnoha studií. Styl života se od minulosti značně změnil z původně loveckého, kdy byla potřeba vynaložit větší úsilí, zejména fyzické, k obstarávání potravy, přes období domestikace zvířat a cíleného pěstování rostlin se stravou založenou spíše na obilovinách, kořenech a hlízách rostlin, na moderní způsob života spolu se začátkem zemědělství a spíše přebytkem energeticky bohaté potravy. Odhaduje se, že právě v období lovectví se formoval genom s tzv. šetřícími genotypy, který připravoval lidi na období nedostatku potravy a na hlad. Kromě změny v jídelníčku se v minulém století změnily i naše pohybové návyky, povětšinou vysoce procesované potraviny a sedací způsob života již nejsou šetřícím genům příliš nakloněné. Šetřící geny mají za úkol energii ukládat, což bylo v té době výhodné, nicméně nyní, kdy je potravy více a na mnoha místech již nehrozí riziko hladovění jako v minulosti, představují tyto geny pro obyvatelstvo problém v podobě nadměrného ukládání energie a rozvoje metabolických civilizačních chorob. (Chakravarthy a Booth, 2004; Lonard, 2002; Pinhasi, 2005)

K závěru o genetické diverzitě lze shrnout, že po velké migraci obyvatel rodu *Homo sapiens* z Afriky do jiných zeměpisných oblastí různé skupiny vytvářely populace, které se liší od původních afrických obyvatel i od jiných populací. Formovaly se populace adaptované na prostředí, ve kterém žili po mnoho generací. Nicméně současný stav migrace může vést k vytváření subpopulací, které možná budou mít problém se přizpůsobit novým životním podmínkám. Není pochyb o tom, že genetická různorodost vzniklá na základě adaptace se podílí velkou měrou na riziku vzniku metabolických chorob jako je obezita, kardiovaskulární onemocnění a nádory. Mezi populacemi se navíc liší i výskyt deficitů různých nutrientů díky výskytu odlišných alel asociovaných s nemocemi v interakci s klimatem, geografickými faktory atd. (Li, 1969; Ziv a Buchard, 2003; Stover, 2006; Hindorff et al., 2009)

2.2. Nutrigenetika a nutrigenomika

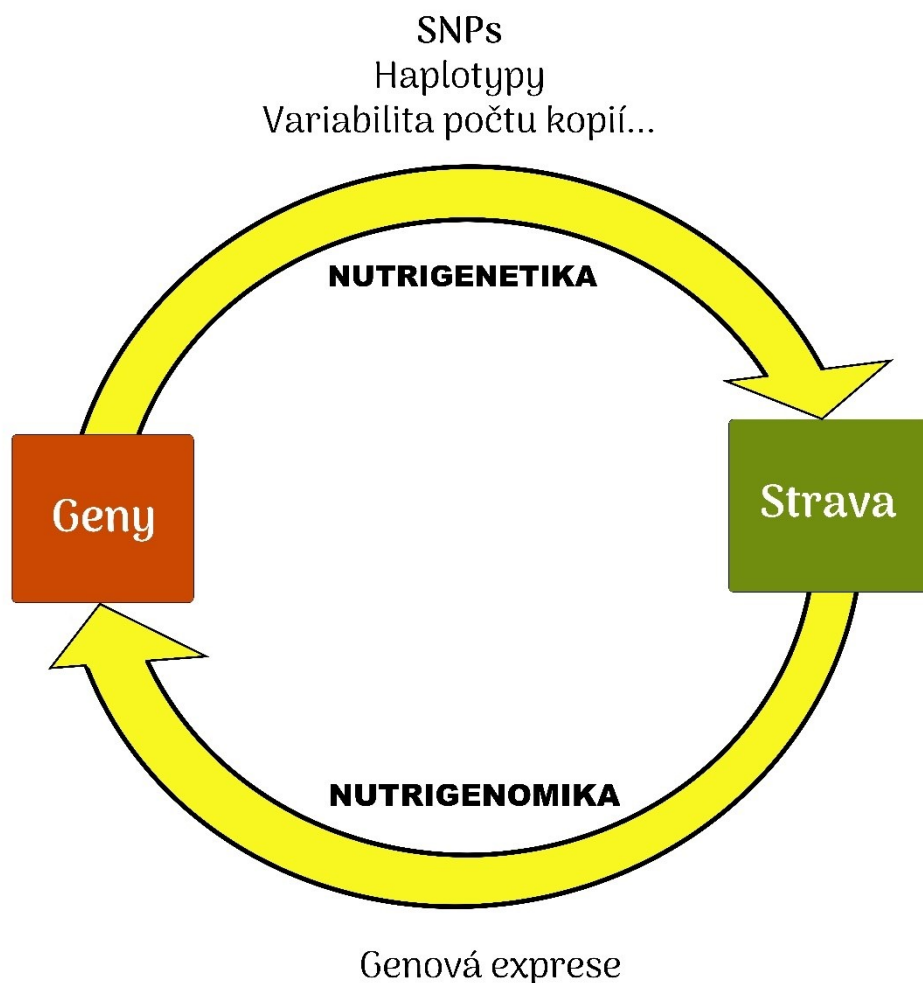
V posledních desetiletích se spolu s rozvojem technologií v mapování lidského genomu a v návaznosti na různé celogenomové asociační studie (WGs) objevuje stále více projektů zaměřených na identifikaci asociace mezi různými polymorfismy genů a onemocněními, těch civilizačních nevyjímaje.

Co se týče faktorů ovlivňujících zdraví, jedním z těch, které můžeme ovlivňovat, je strava. K pochopení významu různých typů potravin, různých druhů diet a jak tyto složky

ovlivňují náš organismus, musíme znát nejen chemické složení těchto potravin a fyziologii našeho těla, ale také způsob interakce mezi složkami stravy a našimi geny, případně jak budou naše geny reagovat na různé typy potravin, nebo na změnu jejich skladby.

Naše genetická výbava, kterou jsme zdělili po našich předcích, částečně determinuje, jak citliví jsme k různým onemocněním. Vnější faktory včetně stravy tak mohou určovat, u koho se takové onemocnění nakonec rozvíjí a manifestuje. Reakce na jeden vnější podnět u různých osob může být odlišná, za což mohou naše geny, přesněji ta genová varianta, která zapříčiňuje jinou míru citlivosti na změnu prostředí či míru citlivosti k některým chorobám.

Rozlišujeme nutrigenetiku a nutrigenomiku (obrázek 1):



Obrázek 1- Nutrigenetika a nutrigenomika (upraveno podle Farhud et al., 2010)

- **Nutrigenetika:** zkoumá roli různých genových variant v odpovědi na stravu/změny ve stravě.

Je známo, že genetická různorodost způsobuje různou míru tolerance vůči složkám potravy u odlišných subpopulací, což může znamenat, že každá taková subpopulace bude mít zcela odlišné stravovací požadavky v prevenci, oddálení či v terapii chorob. Nutrigenetika nám tedy říká, jak náš genetický profil ovlivňuje odpověď organismu na různé složky stravy, a to především prostřednictvím regulace procesu absorpce a metabolismu různých živin.

- **Nutrigenomika:** zkoumá vliv stravy na genovou expresi.

Nutrigenomika na rozdíl od nutrigenetiky poskytuje poznatky ohledně hranice mezi zdravím a nemocí, ať už regulací genové exprese jedince, nebo ovlivněním struktury jeho genetické informace.

(Simopoulos, 2004; Farhud et al., 2010)

2.3. Metabolické civilizační onemocnění

Jako metabolická civilizační onemocnění je označena skupina chorob, které mají několik společných znaků: vyznačují se dlouhou dobou trvání a jsou výsledkem genetických a patofyziologických faktorů a faktorů prostředí.

Chronická neinfekční onemocnění jsou stále nejčastějšími příčinami mortality na globálním měřítku, především v rozvinutějších zemích. Z těch metabolických jsou to zejména kardiovaskulární onemocnění a diabetes mellitus. Předpokládá se, že za rostoucí incidenci metabolických civilizačních onemocnění může rychlá a neplánovaná urbanizace a globalizace, nezdravá životospráva, ale také stárnutí obyvatel. Z životního stylu primárně nezdravá strava a nedostatek pohybu vedou ke zvýšení krevního tlaku, zvýšené glykémii, dyslipidémii a obezitě a jsou významnými rizikovými faktory pro KVO.

(WHO, 2022)

2.3.1. Obezita

Obezita je aktuálním tématem medicíny již řadu let. Data z NCD Risk factor Collaboration z roku 2016 ukazují, že u téměř 2 miliard dospělých jedinců byla diagnostikována nadváha a 671 milionů dospělých mělo obezitu, což je trojnásobek počtu případů v roce 1975. Trend v prevalenci se také mírně změnil mezi jednotlivými populacemi. Zatímco prevalence obezity v nejrozvinutějších zemích má spíše klesající tendenci, v méně rozvinutých a rozvojových zemích je naopak zaznamenán nárůst incidencí. (Abarca-Gómez, 2016)

Přestože lze obezitu jednoduše předpokládat na základě dlouhodobě pozitivní balance energetického příjmu, míra obezity, způsob ukládání tuku a tělesné proporce nejsou u každého jedince se stejnou energetickou bilancí stejné.

Nemonogenní obezita, tedy nejběžnější forma obezity, je onemocnění, které má multifaktoriální příčinu. Podílí se na ní mnoho faktorů vnějších i vnitřních, které se vzájemně ovlivňují. Prostřednictvím studií na dvojčatech a na adoptovaných dětech se odhaduje, že dědičnost BMI a tělesného tuku se pohybuje v rozmezí 25–40 %. Jde o tzv. obezitu polygenní, kdy má jeden polymorfismus s minoritním efektem na tělesnou hmotnost relativně mírný vliv na celou tělesnou kompozici. Kombinace různých variant více genů s vlivem na tělesnou kompozici ale může vést ke značně odlišnému výskytu obezity v různých populacích. Nelze opomenout fakt, že za epidemii obezity v posledních dekáдах může i změna životního stylu z poměrně aktivního na poněkud pohodovější s daleko větším výběrem nejen chuťově, ale i energeticky bohatých potravin a nápojů. (Bellia et al., 2009; Henneman et al., 2008)

Výsledky studií ukazují, že geny ovlivňující BMI většinou kódují proteiny ovlivňující zejména chuťové vjemy a preference v příjmu potravy. Oproti tomu geny uplatňující se v rozložení tuku v těle jsou většinou geny účastníci se metabolismu adipocytů.

Je známo více než 300 SNPs v asociaci s obezitou. Mezi geny ovlivňující tělesnou hmotnost/rozložení tukové hmoty/tělesnou stavbu patří např. FTO, PPAR γ , MC4R, TCF7L2...

(Dai et al., 2013; Rankinen et al., 2013)

2.3.2. Diabetes mellitus 2. typu

Předpokládá se, že zhruba 60–90 % případů DM2T souvisí s obezitou nebo nárůstem váhy. Podobně jako jiné civilizační metabolické choroby je výsledkem rizikové genetické predispozice umocněné o nevhodnou skladbu jídelníčku a nedostatek fyzické aktivity. (Simopoulos a Ordovas, 2004)

Ze studií vyplývá, že dědičnost se na rozvoji DM2T podílí z cca poloviny. Jedinci s pozitivní rodinnou anamnézou mezi příbuznými prvního stupně mají až třikrát vyšší pravděpodobnost manifestace DM2T. (Gloyn, 2003)

Podle WHO (2022) je celosvětově kolem 422 milionů lidí s DM2T. Narůstající tendenci této nemoci zaznamenáváme nejen v rozvinutých zemích západního světa, ale v posledních letech již i v mnoha rozvojových asijských zemích. Při porovnání rozdílů v patofyziologii DM2T mezi Asiaty a obyvateli Spojených států se zjistilo několik zásadních rozdílů. Podle Chana a kol. (2009) se diabetes v asijské populaci manifestuje v nižším věku, při nižším stupni obezity/při nižším BMI, a při stejném nárůstu hmotnosti jako u pacientů kavkazské rasy se vyskytuje ve vyšší míře. Mezi Asiaty neplatí přímá úměra mezi výskytem DM2T a výskytem obezity, a i malý nárůst hmotnosti v dospělosti u Asiaticů významně zvyšuje jejich riziko vzniku DM2T. Vyšetření pomocí CT odhalilo, že Asiaté mají při stejném obvodu pasu jako Evropané více viscerálního tuku. Větší pravděpodobnost abdominálního ukládání tuku spolu s nižší svalovou hmotou vedoucí k tzv. „metabolicky

obéznímu fenotypu“ u jedinců s normální tělesnou hmotností představuje u obyvatel asijské rasy větší riziko inzulínové rezistence a DM2T. (Yoon et al., 2006; Lear et al., 2007)

Díky GWAs dnes známe řadu genů asociovaných s DM2T, jejichž frekvence alel se mezi jednotlivými etniky významně liší. Je to například případ běžných variant genu TCF7L2, které se vyskytují v evropské populaci ve frekvenci 20–30 % - u Asiatů se vyskytují jen ve 3–5 %. (Ng et al., 2008)

Práce Hua a kol. (2011) naznačuje, že strava západního typu je spojena s vyšším rizikem vzniku DM2T u lidí s vyšším genetickým rizikovým skóre (GRS), tedy s vyšším počtem SNPs pro DM2T než je tomu u těch, kteří mají nižší GRS.

2.3.3. Kardiovaskulární onemocnění

Kardiovaskulární onemocnění jsou nejčastějšími příčinami smrti celosvětově. Je takto označována skupina chorob, které postihují srdce a cévní soustavu, mezi něž se řadí například ischemická choroba srdeční, choroby cerebrovaskulární, periferní arteriální onemocnění, tromboembolická choroba atd. (WHO, 2021)

Na etiopatogenezi KVO se podílí řada příčin, jak genetických, tak i vnějších. Rizikové faktory pro KVO mohou být čistě behaviorálně-nutriční, jako je nadměrná konzumace alkoholu, nedostatečný příjem ovoce a zeleniny či fyzická inaktivita, nebo jsou to metabolické poruchy, jež mají genetické pozadí, nicméně mohou být ovlivnitelné dietou/pohybovou aktivitou: obezita, DM2T, hypertenze a dyslipidémie. (De Caterina, 2007)

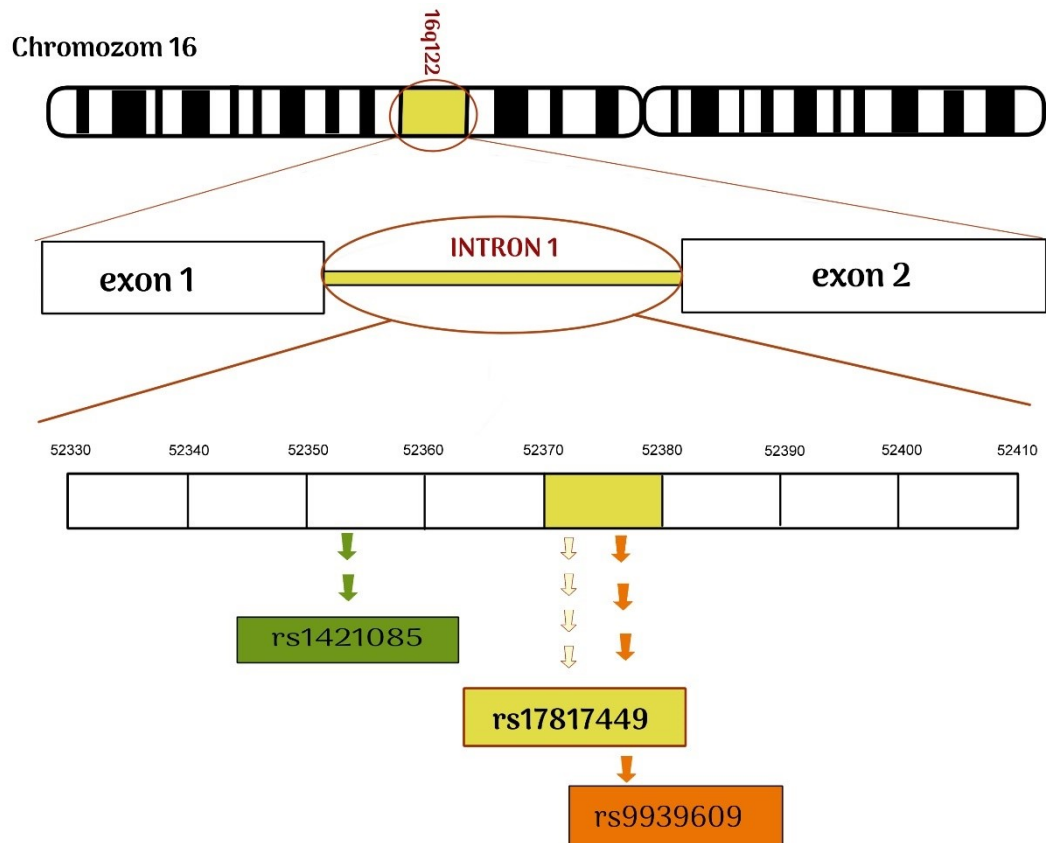
Prostřednictvím GWAs byly odhaleny a následně ověřovány a potvrzeny desítky polymorfismů, které jsou asociovány s KVO. Kromě genů, které mají signifikantní vliv na většinu metabolických chorob jako je DM, obezita a KVO, se na příčině KVO podílí i jiné geny, které jsou pro ně specifitější. Jde například o geny účastníce se zánětlivého procesu (hs-CRP, gen pro IL-6, gen pro TNF- α , gen pro IL-1, atd.), metabolických drah (SLC₂A₄, INS – gen pro inzulín, LEP – gen pro leptin, ADIPOQ – gen pro adiponectin aj.), oxidativního stresu (MPO – gen pro myeloperoxidázu, MTHFR – gen pro methyentetrahydrofolát-reduktázu, TCN₂ – gen pro transkobalamin), hemostázy (gen pro fibrinogen, gen pro faktor VII a faktor VIII), či nekrózy (TNNI₃ – gen pro troponin I₃, CKM – gen pro kreatinin-kinázu). V metabolismu lipidů jsou významné zejména: gen pro LDLR, gen pro Lp-(a) a geny pro apolipoproteiny (A, B, E). (Musonda et al., 2022)

Předem znát naše genetické predispozice k určitým onemocněním či stavům a pochopit interakce mezi geny/variantami genů a stravou v patogenezi nemocí je proto velice důležité nejen v prevenci, ale i v případné terapii. Strava může napomáhat rychlejší regeneraci tkání, nebo prohloubit inzulínovou rezistenci, zánětlivé procesy či aterosklerózu (Scuteri, 2007). Intervencí ať už pohybovou nebo stravovací můžeme jednak oddálit rozvoj KVO, ale také zabránit jejich komplikacím v pozdějších fázích.

3. Nutrigeneticky funkční geny a jejich polymorfismy

3.1. Gen FTO a jeho polymorfismy

FTO je označován jako nejvýznamnější dosud známý gen pro genetickou predispozici k obezitě. Tento gen je vysoce polymorfní a několik jeho variant je spojováno s vyšším BMI nebo obezitou. Mezi nejsilnější varianty mající signifikantní vliv na BMI jsou intronové varianty: rs17817449, rs9939609, rs1421085, a další. (Speliotes et al., 2010)



Obrázek 2 - Struktura genu FTO a jeho polymorfismy (upraveno podle Yang et al., 2017)

Gen FTO je lokalizován na dlouhém ramenu chromozomu 16 (16q12.2) (Obrázek 2). Poprvé byl protein FTO popsán jako demethyláza N6-methyladenosinu závislá na železe a 2-oxoglutarátu. Tato demethyláza je důležitá především v regulaci post-transkripční genové exprese a může tak ovlivnit mnoho pato/fyziologických procesů včetně rozvoje nádorů, obezity atd. SNP (jednonukleotidové polymorfismy) genu FTO byly dány do souvislosti s výskytem BMI. Pomocí GWAS byl FTO identifikován jako první gen asociovaný s běžnou formou obezity. Varianty FTO byly spojovány i s rizikem výskytu DM2T, ale pozdější analýzy ukázaly, že tato korelace je spíše zprostředkována obezitou/vyšším BMI. (Ganef et al., 2019; Zhou et al., 2020; Frayling et al., 2007; Gerken et al., 2007)

U zvířecích FTO knock-out modelů byla popisována postnatální růstová retardace, snížený příjem potravy a redukce tukové tkáně, naopak nadměrná exprese FTO vedla ke zmnožení tukové tkáně. Mechanismus, kterým FTO ovlivňuje tělesnou váhu, je však stále neznámý. GWAS odhalily, že některé SNP ležící v intronu 1 genu FTO jsou asociovány s vyšším rizikem pro nadměrný hlad, zvýšený příjem potravy a následně pro obezitu. Snížená exprese v FTO genu vede k vyššímu příjmu potravy, a naopak nadměrná exprese FTO genu vede ke sníženému příjmu u zvířecích modelů. (Haupt et al., 2009; Tanofsky-Kraff et al., 2009)

V rodinách s mutací FTO projevující se nefunkčností proteinu jsou pozorovány mnohočetné malformace včetně mikrocefalie, faciálních dimorfismů, retardace růstu a mozkových deficitů s pozdním psychomotorickým vývojem, ale bez známky abnormálního ukládání tuku, což naznačuje, že varianty v FTO mohou mít nepřímý vliv na energetický metabolismus ovlivněním genů v okolí. (Speakman et al., 2008)

Exprimován je ve značné míře v celém organismu, nejvyšší míra exprese FTO je však zaznamenána v hypotalamu, v oblasti, kde se mimo jiné nachází centrum pro regulaci příjmu potravy, exprese je snížena po 24 až 48 hodinách hladovění a zvyšuje se po 8 až 10 týdnech příjmu stravy bohaté na tuky. (Frayling et al., 2007; Gerken et al., 2007)

Asociace varianty rs17817449 s obezitou byla nalezena a následně potvrzena v různých populacích napříč kontinenty – a to jak u Evropanů (Čechů), tak u Asiatů (Korejců). (Dina et al., 2007; Hubáček et al., 2008; Cha et al., 2008)

Byly provedeny i studie prokazující asociaci mezi FTO a vyšším rizikem pro jiná onemocnění. Jedná se například o syndrom polycystických ovarií či některé druhy nádorů, a to i u neobéznic. (Li et al., 2013; Brennan et al., 2009)

3.2.Gen TCF7L2

3.2.1. Gen TCF7L2 a jeho polymorfismy

Gen TCF7L2 byl objeven v roce 2006. Tento gen je exprimován v tukové tkáni a ovlivňuje regulaci adipogeneze. Míra exprese TCF7L2 je v korelaci s homeostázou glukózy i lipidů a je označován jako jeden z nejdůležitějších genů zodpovědných za vznik DM2T. (Geoghegan et al., 2019; Noordam et al., 2018; Haupt, 2010)

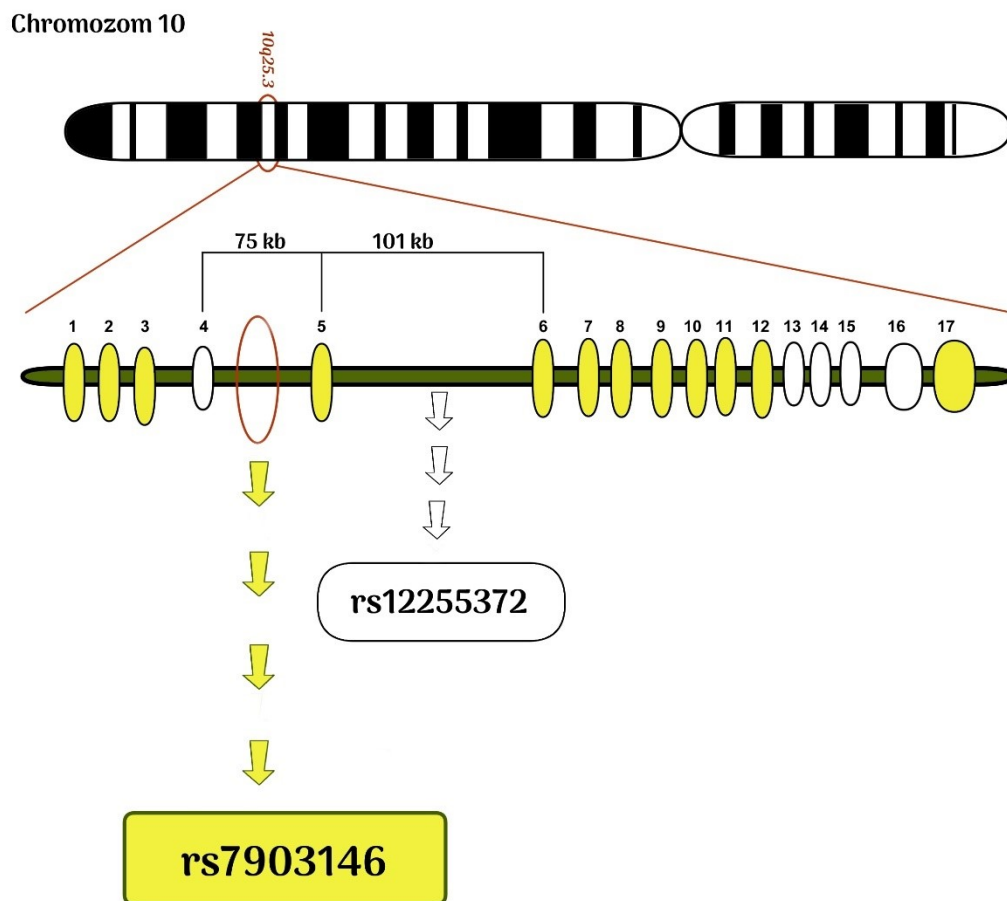
Gen TCF7L2 je lokalizován na chromozomu 10 (10q25.3) a má 17 exonů. (Duval et al., 2000), (Obrázek 3)

Tento gen byl původně znám jako TCF-4. Patří do rodiny T-cel factor s HMG-box transkripčními faktory a funguje jako efektor v signální dráze Wnt. Tyto faktory jsou stimulovány Wnt ligandy, poté se navážou na jaderný β -catenin a vytvoří spolu dvoudílný transkripční faktor cat/TCF, který stimuluje cílovou Wnt expresi. Komplex cat/TCF může

též působit jako efektor pro jiné signální molekuly, jako jsou peptidové hormony, IGF-1, inzulin, LPA. (Jin et al., 2008; Desbois-Mouthon et al., 2001)

Dva SNPs v genu TCF7L2 jsou dávány do souvislosti se zvýšeným rizikem DM2T plynoucím z nefunkčnosti β -buněk v odpovědi na glukózu a nedostatečné sekrece inzulinu: rs7903146 a rs12255372. Zejména varianta rs7903146 stále představuje jednu z nejsilnějších variant ve spojitosti se zvýšeným rizikem vzniku DM2T. Předpokládá se, že se rovněž podílí na rozvoji dyslipidémie a na vyšším obvodu pasu, inzulinové rezistenci, abdominální obezitě a hypertenzi. (Florez et al., 2006; Cauchi et al., 2007; Povel et al., 2011)

Jako rizikové jsou popsány genotypy TT a TC u rs7903146, kdy jedinci nesoucí alelu T mají až o 50 % sníženou sekreci inzulinu β -buňkami při orálním glukózovém tolerančním testu oproti jedincům bez této alely. Mimo to jsou tyto genotypy také spojovány s nižší mírou redukce hmotnosti po intervenci. (Villareal et al., 2010; Haupt et al., 2010)



Obrázek 3 - Struktura genu TCF7L2 a jeho polymorfismy (upraveno podle Wilfred et al., 2012)

3.2.2. Role TCF7L2 v metabolismu glukózy a lipidů:

Játra:

Wnt signální dráha je důležitá jak pro vývoj jater, tak pro jejich metabolismus a regeneraci. Zejména metabolismus glukózy v játrech je pod značným vlivem této signální dráhy, kdy role TCF7L2 v jaterní glukoneogenezi byla potvrzena: inhibicí TCF7L2 lze dosáhnout zvýšené bazální produkce glukózy v játrech doprovázené vyšší expresí glukoneogenních genů (Fb1, Pck1, G6pc...), nadměrná exprese genu naopak vede k opačnému fenotypu a značně snižuje jaterní produkci glukózy. Někteří autoři tak předpokládají, že rizikové varianty genu TCF7L2 mohou negativně ovlivnit jak glykémii na lačno, tak postprandiální glykémii. (Norton et al., 2011; Norton et al., 2014)

Pankreatické β -buňky:

TCF7L2 ovlivňuje proliferaci a funkci β -buněk, stejně tak sekreci inzulínu regulací exprese GLUT2 a GLP-1R. (Shu et al., 2009; Shao et al., 2018)

Tuková tkáň:

Jako klíčový regulátor v Wnt/ β -cateninové signalizační dráze má TCF7L2 velký význam v adipogenezi: ovlivňuje diferenciaci preadipocytů, reguluje velikost adipocytů a jejich endokrinní funkci i metabolismus glukózy. (Geoghegan et al., 2019; Bennett et al., 2002)

3.3.Gen MC4R

3.3.1. Význam melanokortinových receptorů

Melanokortinovými receptory, jak napovídá jejich název, je označována skupina 5 (MC1R – MC5R) typů receptorů spřažených s G-proteinem, které jsou aktivovány melanokortiny. Do skupiny melanokortinů zahrnujeme melanocyty-stimulující hormon (MSH) a adenokortikotropní hormon (ACTH), které vznikají z pre-prohormonu propionomelanortinu (POMC) produkovaného v hypofýze. Kromě hormonů odvozených od POMC jsou melanokortinové receptory aktivovány také endogenními antagonisty – Agouti proteinem a Agouti-příbuzným proteinem (AgRP).

V regulaci energetického metabolismu je nejvýznamnější MC4R, který se exprimuje zejména v centrálním nervovém systému, je součástí leptin-melanocortinové signální dráhy a je inhibován endogenním antagonistou agouti-related protein (AGRP) a aktivován agonistou α -melanocyte stimulating hormone (α MSH). Vazba α -MSH na MC4R slouží jako anorexigenní signál a vede ke snížení příjmu potravy a zvýšenému energetickému výdeji, (obrázek 4).

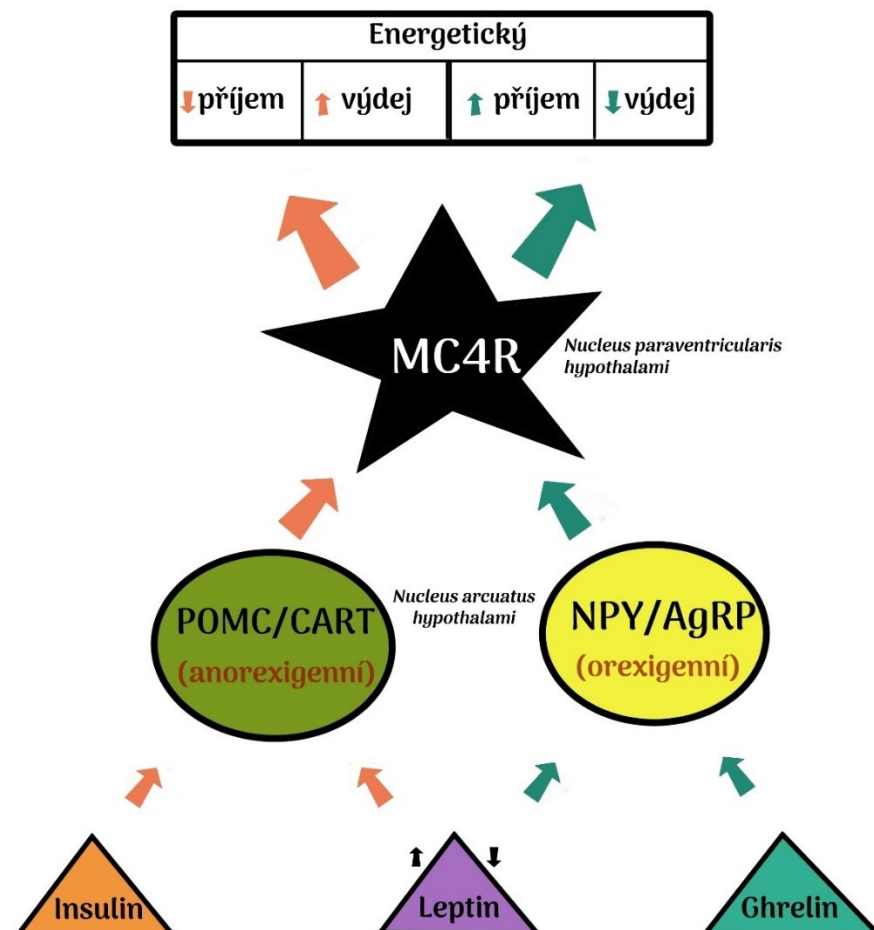
(Gantz et al., 1993; Cone, 2005; Beckers et al., 2009)

3.3.2. Gen MC4R a jeho polymorfismy

Gen MC4R je po FTO označován jako druhý nejsilnější gen ovlivňující BMI/obezitu (efekt FTO varianty na BMI je větší než MC4R o $0,1 \text{ kg/m}^2 - 0,33$ vs $0,23 \text{ kg/m}^2$). Na rozdíl od FTO se však nenašla asociace mezi MC4R a celkovým energetickým příjmem či příjmem jednotlivých makronutrientů. (Thomsen et al., 2012)

Polymorfismus rs17782313 ležící 188 kb od MC4R je spojován se zvýšeným příjmem energie a se signifikantně vyšším BMI i jinými znaky obezity u dětí i dospělých, kdy každá riziková alela vede ke zvýšení BMI o 0,2 jednotky. (Loos et al., 2008; Kochetova, 2015)

Další práce našly také spojení mezi rs17782313 a dalšími rizikovými faktory pro KVO: inzulínová rezistence a DM2T, hypertriglyceridémie u nositelů alely C polymorfismu. (Tschritter et al., 2011; Katsuura-Kamano et al., 2014)



Obrázek 4 - Funkce MC4R v energetické regulaci (upraveno podle Fani et al., 2014)

3.4. Gen ApoE

3.4.1. Apolipoprotein E

Apolipoprotein E má v organismu řadu funkcí. Je však pravděpodobně nejvíce znám jako významný regulátor v metabolismu lipoproteinů a lipidů. Je součástí chylomikronů, VLDL, IDL, LDL HDL a Lp(a). Tento apolipoprotein funguje jako ligand pro receptory lipoproteinů a podílí se tak na regulaci jejich vychytávání z cirkulace a následné degradace. APOE tímto způsobem kontroluje jejich hladinu v plazmě. Účastní se rovněž koagulace, oxidativních procesů, homeostázy a regulace funkce gliových buněk, makrofágů, neuronů, stejně tak ovlivňuje zánětlivé procesy a proliferaci buněk. Tento apolipoprotein může též inhibovat lipoproteinovou lipázu a lipólýzu lipoproteinů bohatých na triglyceridy. Byla prokázána i jeho role v potenciálním zvýšení produkce VLDL v játrech. Různé koncentrace ApoE jsou spojovány s jinou příčinou mortality: vysoká hladina plazmatického ApoE je asociována s vyšší mortalitou na KVO a nádory, kdežto nízké hladiny s vyšší mortalitou při demencích. (Packard a Shepherd, 1997; Hara et al., 2006; Rasmussen et al., 2019)

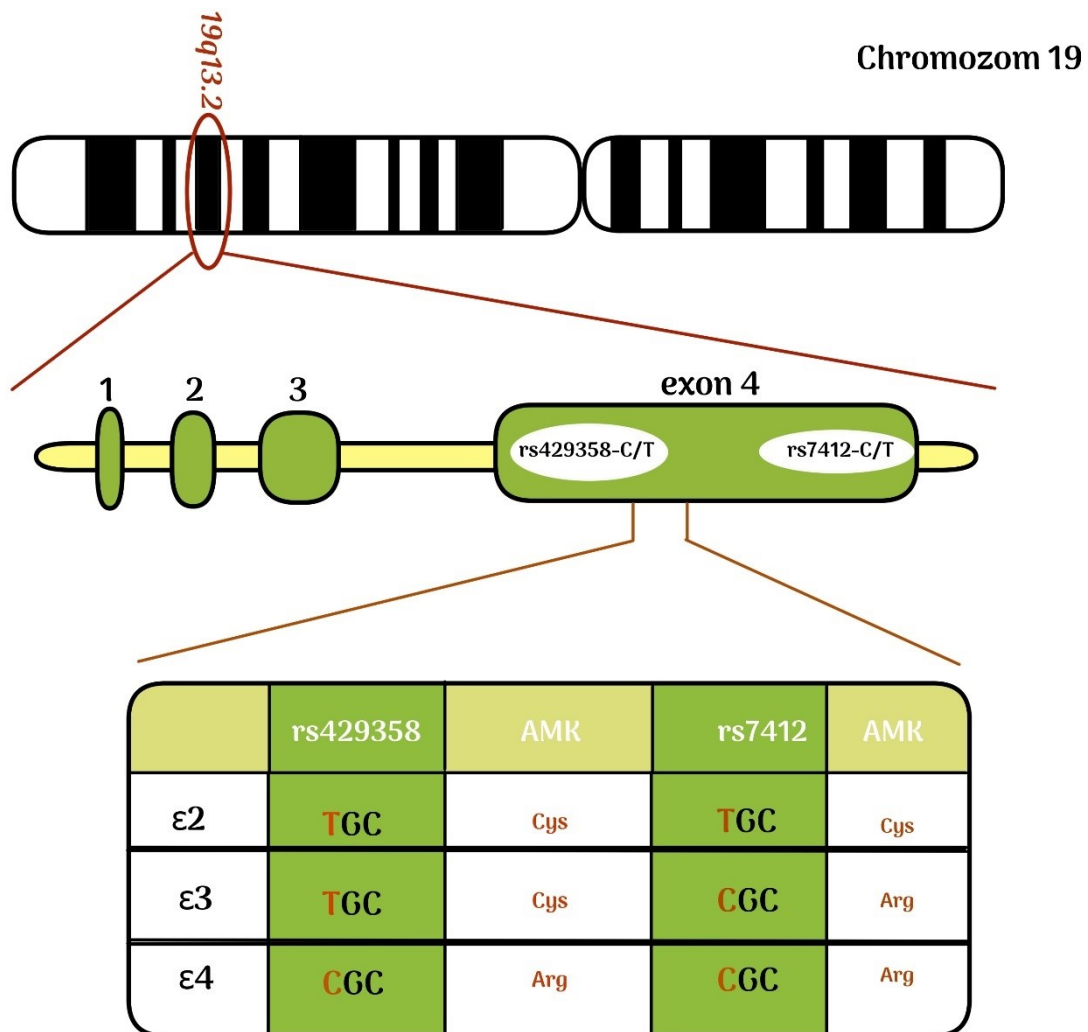
3.4.2. Gen ApoE a jeho polymorfismy

Gen APOE, který kóduje apolipoprotein E, se exprimuje v mnoha tkáních, nejvíce však v játrech, dále v mozku, ve slezině, v ledvinách, v gonádách a v makrofázích. Je dlouhý 3,7 kilobází se 4 exony a je lokalizován na chromozomu 19 (19q13.2). Kóduje prekurzor apolipoproteinu E se 317 aminokyselinami. Po odtržení 18aminokyselinového signálního peptidu z prekurzoru vzniká apolipoprotein E jako 34-kDa dlouhý protein s 299 aminokyselinami a je složen ze dvou strukturálních domén, kdy amino-terminální konec obsahuje místo pro vazbu na LDL částici. (Marais, 2019)

Dva missense (záměna nukleotidu v sekvenci má za následek zařazení jiné aminokyseliny do polypeptidového řetězce) SNPs v genu APOE jsou příčinou tří izoform tohoto genu: produktem alely $\epsilon 2$ je Apo-E2, alela $\epsilon 3$ dává vznik Apo-E3 a alela $\epsilon 4$ vede ke vzniku Apo-E4. Izoforma E2 obsahuje Cystin v pozici 112 (rs7412; p.Arg176Cys) i 158 (rs429358), E3 obsahuje v pozici 112 Cystin a v pozici 158 Arginin, zatímco polymorfismus E4 obsahuje v obou pozicích Arginin (obrázek 5). Tyto aminokyseliny mění konformaci vazebného místa proteinu k receptorům, což vede k odlišné aktivitě a vazebné afinitě jednotlivých lipoproteinů k receptorům i jejich stabilitě, tudíž každá z izoform má za následek odlišné koncentrace lipoproteinů v krvi. Nejběžnější alelou je $\epsilon 3$. Apolipoprotein E2 je znám pro svou asociaci s hyperlipoproteinémií typu III díky nefunkční vazebné aktivitě s receptory. Varianta Apo-E4 sice vykazuje normální vazebnou funkci, ale může vést ke zvýšené hladině cholesterolu a LDL. (Mahley et al., 1988; Mahley et al., 2009)

Nejaterogennější z těchto izoform je alela E4. Nositelé alely E4 mají až o 31 % vyšší hladinu LDL než nositelé alely E2. Jedinci s genotypem obsahujícím APOE4 mají také vyšší krevní tlak či vyšší riziko KVO, ale na druhou stranu lépe reagují na dietní intervence, kdy

vykazují výraznější pokles TAG po suplementaci EPA a DHA. (Dwyer et al., 2004; Bennett et al., 2007)



Obrázek 5 - gen ApoE a jeho varianty (upraveno podle Abondio et al., 2019)

3.5.Gen LCT a laktózová intolerance

3.5.1. Laktóza

Laktóza je disacharid vyskytující se hlavně v mléce a mléčných produktech, pro jehož vstřebávání je nutná hydrolyza na monosacharidy - glukózu a galaktózu. Enzym zodpovědný za hydrolyzu laktózy se nazývá laktáza (nebo také β -galactosidáza či lactase-phlorizin hydroláza = LPH) a je přítomen v kartáčovém lemu tenkého střeva. Tento transmembránový glykoprotein lokalizovaný na luminální ploše membrány microvilli enterocytů může hydrolyzovat nejen laktózu, ale i laktosylceramid, celobiózu, celotriózu, flavonoidní glykosidy a phlorizin. (Naim, 2001)

3.5.2. Laktózová intolerance a laktázová perzistence

Člověk vykazuje nejvyšší aktivitu laktázy během kojeneckého období. Po tomto období se začíná aktivita LPH značně snižovat kvůli její klesající produkci. Tento stav je také znám jako laktázová nonperzistence, jejímž následkem je neschopnost trávit mléčný cukr - laktózu. Opačný stav se nazývá laktázová perzistence. (Naim, 2001)

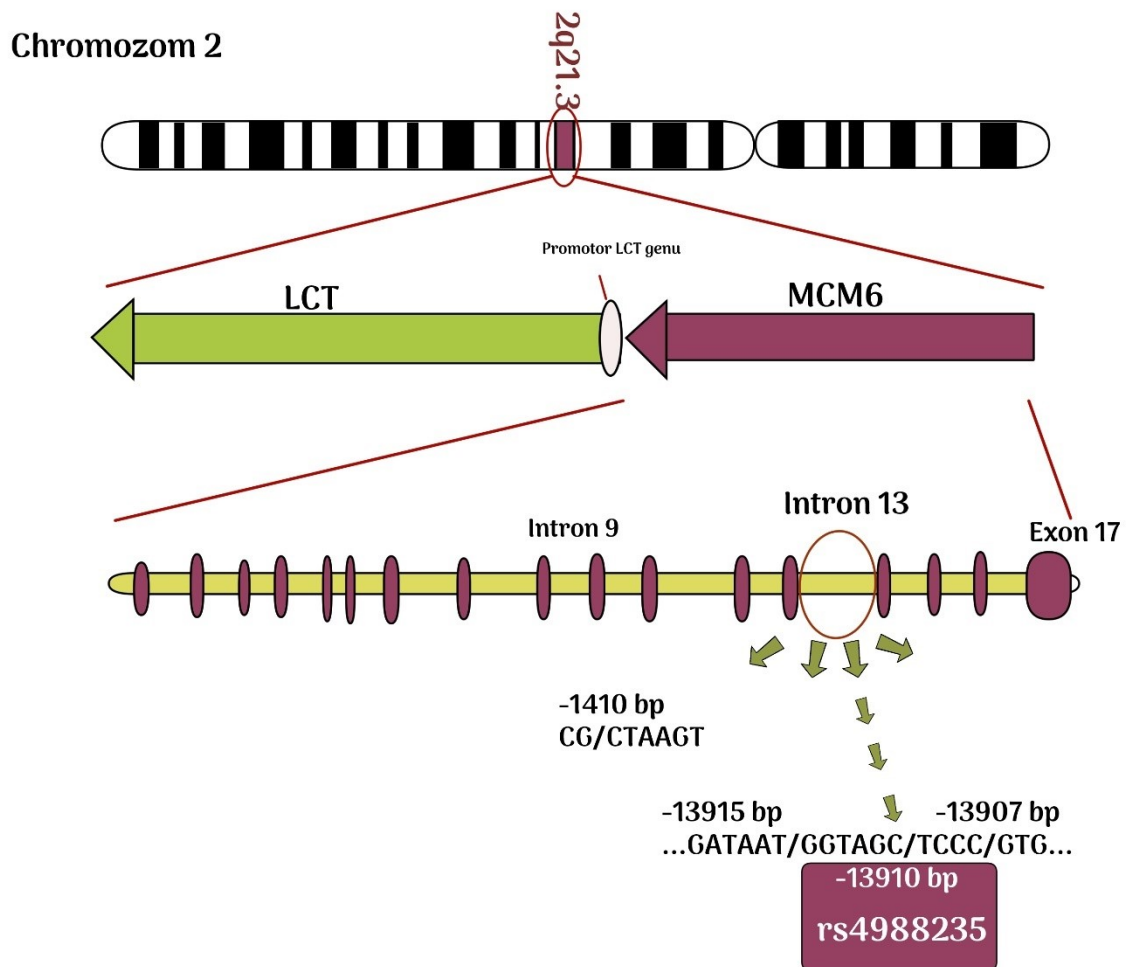
Laktázová intolerance označuje stav, kdy jedinec vykazuje postupně s věkem snižující se aktivitu laktázy. Může se projevit různými gastrointestinálními příznaky po požití jídla obsahujícího laktózu. Příznaky jako osmotický průjem, bolest břicha, meteorismus nebo flatulence jsou způsobeny malabsorpcí laktózy, následnou přítomností laktózy i v tlustém střevě a její fermentací střevními bakteriemi za vzniku plynů a laktátu. Laktázová intolerance není na rozdíl od vzácné vrozené deficiencie laktázy nemocí. Přestože schopnost trávit laktózu u dospělých může být mnohými vnímáno jako samozřejmost, není tomu tak. Odhaduje se, že až dvě třetiny světové populace mají laktázovou nonperzistenci. Laktázová perzistence se totiž vyvinula až jako forma evoluční adaptace u lidí v oblastech, kde se začalo pít mléko i v dospělosti. Třebaže laktázová perzistence není původní schopností člověka, může přinést některé výhody nositelům polymorfismu této vlohy, například vyšší příjem vápníku obsaženého v mléčných produktech jako prevence osteoporózy. (Bouchard a Ordovas, 2014; Ségurel a Bon, 2017)

Začátek zemědělství byl pravděpodobným mezníkem ve změně způsobu života, a tudíž i ve způsobu stravování pro lidskou společnost. Vezměme si jako příklad chov dobytka pro mléko, který v Evropě začal před zhruba 9 000 lety a významně změnil skladbu jídelníčku tehdejších obyvatel, ale zřejmě i genetickou výbavu dnešních Evropanů. Konzumace mléka i v dospělosti po mnoha generacích zřejmě vedla k rozšíření schopnosti Evropanů trávit laktózu i v dospělosti a frekvence výskytu laktázové perzistence je v této populaci vysoká. Naopak gen pro laktázu nebyl pod vlivem selekce v asijských populacích, kde frekvence alely pro laktázovou perzistenci ve variantě 13910T buď chybí, nebo se vyskytuje jen velmi zřídka. Pro úplnost lze dodat, že byly objeveny varianty pro LCT vedoucí k laktázové toleranci v populaci východních Afričanů, které jsou zcela odlišné od těch evropských. (Kretchmer, 1971; Voight et al., 2006; Tishkoff et al., 2007)

3.5.3. Polymorfismus pro laktázovou intoleranci/laktázovou perzistenci

LPH je kódován genem pro laktázu (gen LCT) lokalizovaným na chromozomu 2q21. Gen LCT má 17 exonů kódujících 1927 aminokyselin. Laktázová perzistence je dominantně dědičná a je způsobena alespoň 5 nezávislými SNPs v oblasti genu MCM6 (minichromosome maintainance complex component 6). Lokus pro laktázovou perzistenci leží mezi intronem 13 a exonem 17 genu MCM6 a je umístěn směrem k 5'konci genu pro laktázu. Varianta T → C v pozici 3712 a varianta C → T v pozici -13910 (rs4988235) v Evropě vykazují větší schopnost navazovat se na transkripční faktor než původní varianta. Když jsou oba polymorfismy přítomny, aktivita enhanceru ležícího směrem k 5'konci LCT

promotoru je zvýšena a umožňuje tak laktázovou perzistenci až do dospělosti (Obrázek 6). (Enattah et al., 2008; Fang et al., 2012)



Obrázek 6 - LCT a MCM6 (upraveno podle Schulltheis et al., 2011)

Frekvence laktázové perzistence je vyšší v severních oblastech Evropy a postupně klesá směrem k jihu, a je velice nízká v Asii a Africe (Itan et al., 2010; Storhaug et al., 2017).

3.6. Gen ADH1B a konzumace alkoholu

3.6.1. Alkohol

Alkohol (etanol/etylalkohol) je součástí mnoha kultur i sociálních norem a dopad jeho konzumace je předmětem diskuzí již desítky let. Diskutuje se zejména o účinku malého množství alkoholu na zdraví, nicméně těžký alkoholismus má na zdravotní stav prokázaně mnoho nepříznivých účinků jak akutních, tak i chronických. Mezi jeho bezprostřední nebezpečí patří riziko nehod, pádů, z dlouhodobějších negativních dopadů alkoholu jsou to zejména psychické problémy, změny osobnosti, závislost, jaterní cirhóza, nádorová i kardiovaskulární onemocnění. (WHO, 2022)

Míru konzumace alkoholu či riziko vzniku závislosti na alkoholu/alkoholismu ovlivňují jednak sociální normy, a jednak individuální znaky jako je pohlaví, etnikum, věk či socioekonomický stav. (WHO, 2022)

3.6.2. Metabolismus alkoholu

Malý objem alkoholu je vstřebáván a metabolizován hlavně stěnou žaludku, větší objemy nad first-pass kapacitou gastrointestinální sliznice jsou metabolizovány především v játrech. Dávky do 5–10 g etanolu/den jsou metabolizovány enzymem alkoholdehydrogenázou (ADH) na acetaldehyd v žaludku i v játrech. Při dávkách >10 g alkoholu/den se oxidace odehrává také v mikrozomálním etanol-oxidujícím systému (MEOS) zahrnujícím škálu enzymů z rodiny cytochromů P-450. Oxidace acetaldehydu na acetát je zajišťována enzymem aldehyd-dehydrogenázou (ALDH). (Kohlmeier, 2015)

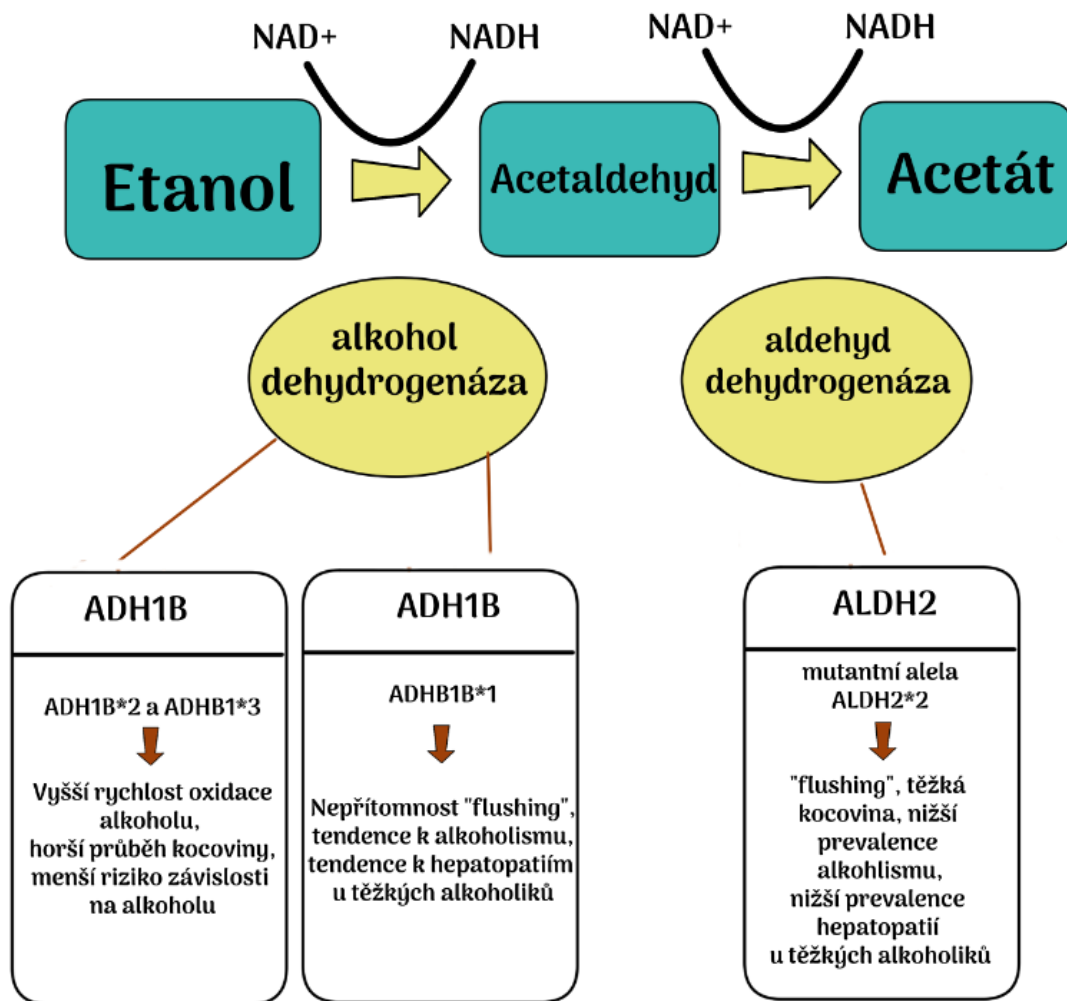
Za nepříjemné příznaky (červenání, nauzea, zvracení, bolest hlavy, tachykardie) po konzumaci alkoholu, jež jsou běžně souhrnně označovány jako kocovina, může nadbytečné množství nahromaděného acetaldehydu, který tak může odradit člověka v konzumaci dalšího alkoholu. Jsou známy různé varianty jak genu pro ADH, tak i genu pro ALDH, které mohou přes acetaldehyd nepřímo ovlivňovat příjem alkoholu. (Sherman a Watson, 2002)

3.6.3. Gen ADH1B a jeho polymorfismy

Oba nejdůležitější enzymy metabolismu alkoholu mají několik izoform kódovaných odlišnými geny. Existuje několik variant (alel) těchto genů s rozdílnými vlastnostmi vedoucími například k různé rychlosti oxidace alkoholu. (Hurley et al., 2002)

Geny pro ADH leží na chromozomu 4 a kódují 7 enzymů ADH, které fungují jako dimery se 2 podjednotkami. Na základě podobnosti v sekvenci jejich aminokyselin a v jejich kinetických vlastnostech jsou rozděleny do 5 tříd. Nejvyšší aktivitu vykazuje třída I – geny pro ADH1A, ADH1B a ADH1C lišící se jednou podjednotkou ($\alpha/\beta/\gamma$). (Hurley et al., 2002; Lee et al., 2006)

ADH1B (rs1229984 anebo Arg49His) existuje ve třech alelických formách lišících se v sekvenci aminokyselin pro β -podjednotku: alela ADH1B*1, která je považována za referenční, kóduje β 1-podjednotku s argininem v pozici 48 a 370; alela ADH1B*2, která je běžná u Asiatů, kóduje β 2-podjednotku s histidinem v pozici 48; ADH1B*3, přítomná zejména u Afričanů, kóduje β 3-podjednotku s cysteinem na pozici 370. Lze tedy říci, že ADH1B vykazuje značné distribuční rozdíly mezi etnickými skupinami. Záměna aminokyseliny na obou podjednotkách β 2 i β 3 se nachází v místě, kde se navazuje NAD⁺ nutné k oxidaci ethanolu. To vede k tomu, že se koenzym z vazby uvolňuje rychleji než u β 1. Formy ADH1B*2 a ADH1B*3 tedy oxidují alkohol na acetaldehyd vyšší rychlostí než forma ADH1B*1, což má za následek nedostatečnou rychlost přeměny a větší akumulaci acetaldehydu po konzumaci alkoholu. Předpokládá se, že osoby s aspoň jednou kopií ADH1B*2 budou mít díky horšímu průběhu kocoviny menší riziko závislosti na alkoholu. (Hurley et al., 2002)



Obrázek 7 - Polymorfismy v metabolismu alkoholu (upraveno podle Yokoyama et al., 2014)

Víme díky množství dochovaných dokumentů, že v minulosti existovaly mezi regiony značné rozdíly nejen ve stravování ale i v příjmu tekutin. Důvodem mohla být kultura, náboženství či jednoduše zvyk. To všechno se promítalo i do genetické výbavy dnešních lidí, kdy kulturní faktory v některých oblastech daly přednost genovým variantám umožňujícím toleranci vůči alkoholu. Jinde se efekt těchto variant naopak nemohl uplatňovat a začaly se tak z populace postupně ztrácet. (Bouchard a Ordovas, 2014)

Významné znaky selekce lze najít v genech pro alkohol-dehydrogenázu u obyvatel východní Asie. Zejména funkční varianta genu ADH1B – Arg47His zde prošla silným přírodním výběrem, jelikož tato varianta pravděpodobně umožňuje i jistou ochranu před toxiny z plesnivějící rýže. V Asii je frekvence této alely častější u populací, které začaly se zemědělstvím poměrně brzo (Korejci, Japonci, Číňané, Hmong-Mieňané, Daici, Austronésiané), naopak nižší výskyt varianty ADH1B-47His lze najít u těch populací, které přešly na zemědělství až v pozdějších obdobích. (Voight et al., 2006; Cavalli-Sforza a Feldman, 2003; Han et al., 2007)

3.7. Gen HFE a hereditární hemochromatóza

3.7.1. Metabolismus železa

Železo je klíčové nejen jako kofaktor v přenosu kyslíku (dýchání), ale také v řadě redoxních reakcí, v metabolismu aminokyselin, lipidů, alkoholu aj. Nejlepšími zdroji železa jsou potraviny obsahující hemové železo (Fe^{3+}) – živočišná strava. Potraviny rostlinného původu, jako například luštěniny, také obsahují železo, ale převážně nehemové s horšími absorpčními vlastnostmi. (Kohlmeier, 2015)

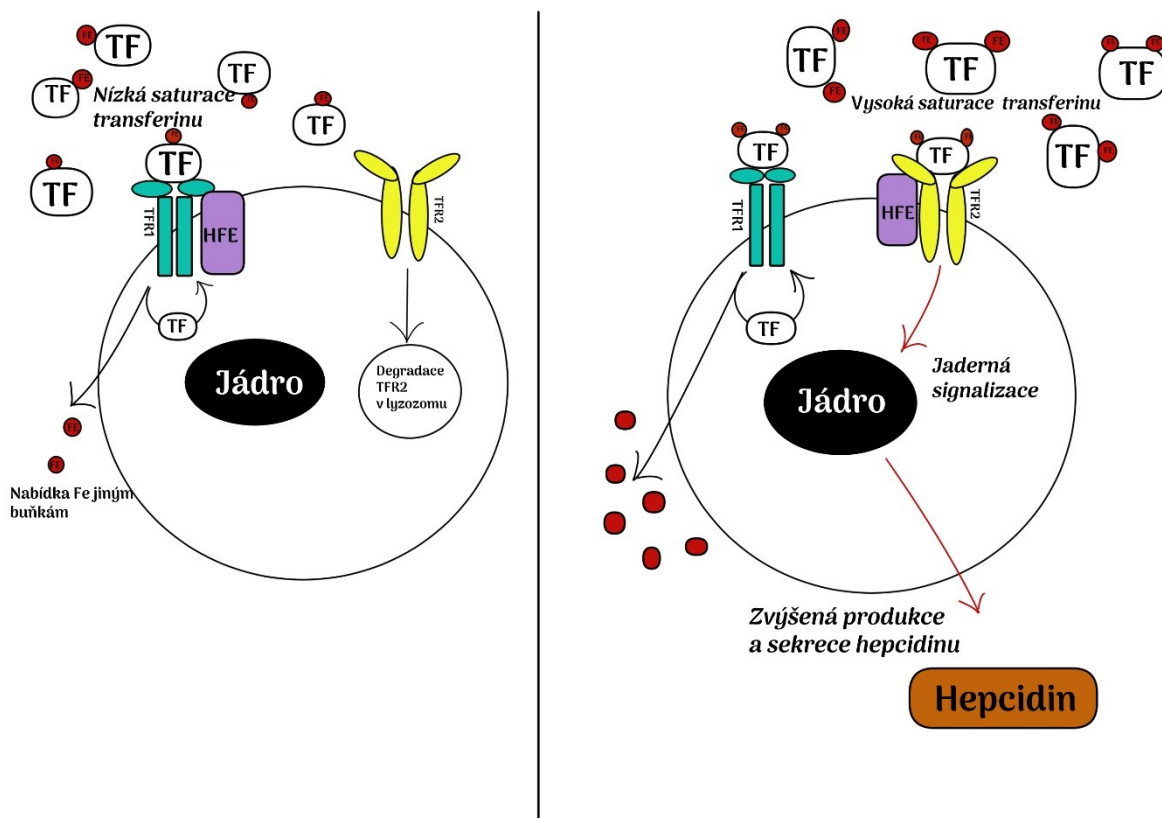
Člověk potřebuje přijmout nejméně 8 mg železa za den, aby pokryl jeho ztráty, s tím, že vegetariáni a menstrující ženy i těhotné a kojící ženy by ho měli přijímat více. Příjem železa, zejména hemového, bývá nedostatečný ve většině oblastí světa, zejména u dětí a mladých žen, což u nich často vede k jeho deficitu. (Kohlmeier, 2015)

V metabolismu železa jsou známy zejména varianty v genech: HFE, TF, $\text{TNF-}\alpha$ a TMPRSS6 . Ví se, že výskyt některých variant snižuje riziko vzniku deficitu železa ve zranitelnějších populacích. Tyto varianty se tak postupem času staly běžnější v některých populacích oproti jiným. (Hentze et al., 2010; Folgueras et al., 2008; Benyamin et al., 2009; Beutler et al., 2002)

3.7.2. Gen HFE a jeho polymorfismy

Gen HFE a jeho asociace s hemochromatózou byly objeveny v roce 1996 Federem a kol. (1996). Tento gen, který se nachází na dlouhém raménku chromozomu 6 (6q) v oblasti HLA třídy I, se skládá z 9609 bp a obsahuje 7 exonů. Gen kóduje membránový protein HFE, jenž reguluje produkci hepcidinu. Hepcidin je protein produkován jaterními buňkami a je nejvýznamnějším regulátorem v transportu železa. Působí prostřednictvím vazby s ferroportinem v tenkém střevě a na makrofázích. Vazbou na ferroportin inhibuje hepcidin transport železa z buněk s následnou degradací v lysosomech. Jedna cesta k regulaci exprese genu pro hepcidin v játrech je kontrola hladiny železa pomocí TfR2. Když je hladina železa vyšší, bývá zvýšená i hladina transferinu, vazby TfR1 jsou nasyceny a transferin je nucen se navázat i na TfR2, který je za normálních podmínek volný. Vazba transferinu na TfR2 spustí kaskádu reakcí, které vyústí ve snížení exprese hepcidinu. HFE je gen, který modifikuje vazebné vlastnosti TfR2 a rozhoduje tak, při jaké koncentraci transferinu začne narůstat exprese genu pro hepcidin (Obrázek 8). (Barbujani et al., 1997; Zhang, 2010)

Existují varianty genu HFE, jejichž nositelé nejsou tolik citliví k deficitu železa a anémii, naopak je u nich nutná vyšší koncentrace transferinu k navýšení produkce hepcidinu: varianta rs1800562A (845G > A neboli Cys282Tyr) nacházející se v exonu 4 a varianty rs1799945G (187C > G či His63Asp) a rs1800730T (193A > T / Ser65Cys), které se nacházejí v exonu 2 genu HFE (Obrázek 9).

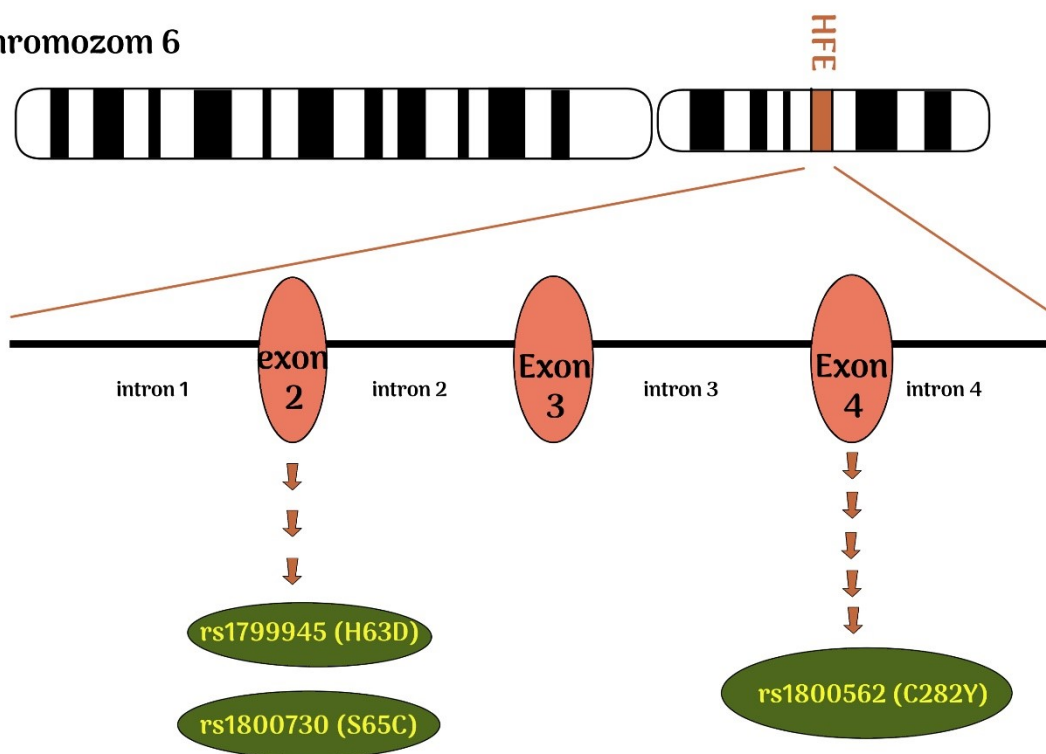


Obrázek 8 - Úloha genu HFE v metabolismu Fe (upraveno podle Lawen a Lane, 2013)

Mezi nejvíce studovanými polymorfismy v tomto genu patří Cys282Tyr a H63D, přičemž více než 80 % případů hemochromatózy je spojeno s variantou C282Y, která blokuje interakci mezi HFE proteinem a receptorem pro transferin, což může být příčinou nadměrné akumulace železa v organismu. Mutace H63D ovlivňuje terciární strukturu HFE proteinu a tím mění regulaci absorpce železa. Mutace S65C má oproti dvou předchozím variantám nižší asociaci s hemochromatózou, byl však potvrzen její vliv na mírnou akumulaci železa. Nositelé těchto mutací více retinují železo a mívají tak násobně vyšší koncentraci volného železa v krvi. V některých populacích se tyto varianty vyskytují ve vyšší frekvenci, a to především v oblastech, kde lidé v minulosti více trpěli na nedostatek železa. V dnešní době však na mnoha místech s vyšším výskytem železo-retinujících variant již není o potraviny bohaté na železo taková nouze, hrozí zde tak spíše riziko manifestace hemochromatózy z nadbytečné akumulace železa. Riziko klinické manifestace hemochromatózy při aspoň dvou kopiích rizikové alely varianty rs1800562 (Cys282Tyr) nebo při 3 kopiích jakékoli z rizikových alel je pak až tisíckrát vyšší než při jejich absenci.

(Feder et al., 1996, Sørensen et al., 2019; Caterina et al., 2019)

Chromozom 6



Obrázek 9 - Gen HFE (upraveno podle de Campos et al., 2019)

3.7.3. Hereditární hemochromatóza

Hereditární hemochromatóza je autozomální recesivní choroba, která se vyznačuje extrémně vysokou hladinou volného železa v těle. Přebytké železo se kumuluje v orgánech, nejvíce v jaterní tkáni, pankreatu, srdci a mozku, kde tvoří ireverzibilní depozity hemosiderinu. Toto onemocnění je poměrně časté zejména u obyvatel kavkazského etnika. Feder a kol. (1996) potvrdil ve své práci výskyt mutace pro variantu Cys282Tyr v genu HFE až u 83 % pacientů s hereditární hemochromatózou.

Časnými nespécifickými příznaky hemochromatózy jsou zejména letargie, malátnost, bolesti břicha, ztráta hmotnosti, ztuhlé klouby nebo artritida. Pozdní příznaky bývají nebezpečnější, hrozí například cirhóza jater, která může vyústit v selhání nebo rakovinu jater. Podobně i pankreas a srdce mohou selhávat. Díky zvýšené hladině železa hrozí zvýšené riziko zejména bakteriálních infekcí a následné sepse.

(Pietrangelo, 2010)

4. Praktická část

4.1. Design studie

Design: Genetická analýza a mezipopulační komparace

4.2. Hypotézy

- Frekvence alel řady genů se liší mezi rasami/populacemi.
 - o Např. výskyt různých alel genu FTO a TCF7L2 mohou mít vliv na prevalenci obezity a diabetes mellitus 2. typu v každé populaci/rase.
- Polymorfismy v genech pro laktázu ve vietnamské populaci se budou výrazně lišit od těch v populaci české, což má za důsledek absence enzymu laktázy u většího procenta vietnamské populace a tudíž i mnohonásobně menší spotřeby mléčných výrobků u Vietnamců než u Čechů.
- Podobně předpokládáme odlišné frekvence alel v genech pro HFE (ovlivňující metabolismus železa) nebo ALDH1B1 (ovlivňující konzumaci alkoholu)

4.3. Cíle

1. Primární cíl: Geneticky analyzovat a porovnávat polymorfismy genů interagujících s výživou a s potenciálním dopadem na rozvoj civilizačních onemocnění a životní styl (obezita, DM2T a laktózová intoleranci) ve dvou populacích – české a vietnamské
2. Sekundární cíle:
 - a. Genetická analýza polymorfismů genů pro FTO, HFE, ALDH1B1, LCT, ...
 - b. Komparace výskytu alel ve zmíněných populacích
 - c. Vztahovat výsledky genotypizací k datům získaným z dotazníkového šetření

4.4. Výzkumný soubor

Dobrovolníci vietnamské národnosti.

Data z české populace jsou již kompletně dostupná v databázi laboratoře Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM)

Vzorky od vietnamských dobrovolníků byly odebrány v průběhu od 11.2022 do 3.2023.

Inclusion kritéria pro nově sbírané vzorky:

- Cca 100 nepříbuzných dobrovolníků vietnamského etnika
- Z každé rodiny max. 2 nepříbuzní členové (např. matka + otec) – zamezení chyb vnesených analýzou pokrevně příbuzných
- Každému z dobrovolníků bude odebrán vzorek DNA stěrem bukalní sliznice.

Exclusion kritéria:

- Pokrevně příbuzní jedinci
- Věk pod 18 let

4.5.Sběr dat

4.5.1. Česká populace

Data reprezentující českou populaci jsme získali ze dvou větších studií: studie post-MONICA a studie rezidentů Jihočeského kraje.

- Projekt MONICA (Monitoring of trends and determinants in cardiovascular disease) vyhlášen WHO sbíral data ze 26 zemí včetně České republiky a měl za cíl zmapovat nejdůležitější determinanty KVO v různých populacích. Vlastní projekt probíhal v ČR (ČSSR) v letech 1985, 1988 a 1992, na něž v pozdějších letech navázaly další nezávislé studie tzv. „Czech post-MONICA study“. Studie post-MONICA se rovněž rozšířila o dalších šest okresů, vzorek byl tedy vybírán z přibližně 10 % české populace. (Cífková, 2010)
- V analýze varianty rs4988235 (pro laktázovou intoleranci) bylo v české populaci 300 dospělých nepříbuzných jedinců bělošské etnika (dle informace vyšetřovaných do generace prarodičů) rezidentů Jihočeského kraje (Hubáček et al., 2017)

4.5.2. Vietnamská populace v České republice

Stěry bukální sliznice k analýze frekvence polymorfismů ve vietnamské menšině byly provedeny na 100 dobrovolnících vietnamského původu, kteří dlouhodobě žijí v ČR. Podmínkou k účasti na výzkumu byl věk nad 18 let a pokrevní nepříbuznost mezi dobrovolníky. Každý z dobrovolníků podepsal před vyšetřením informovaný souhlas (viz přílohu č. 2). Výzkum byl schválen etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny a Fakultní Thomayerovy nemocnice (viz přílohu č. 1).

4.6.Bukální stěr

- **Materiál**
 - o 4N6 FLOQSwabs Genetics sterilní vatová tyčinka se zkumavkou od firmy COPAN
- **Provedení**

Bukální stěr byl proveden setřením bukální sliznice z obou stran krouživým pohybem po dobu minimálně 30 sekund. Část tyčinky se vzorkem se odlomil do zkumavky. Takto získaný vzorek byl skladován při teplotě -20°C, než byl dále zpracován.

4.7.Izolace DNA

Izolací DNA se rozumí technika skládající se z chemických a fyzikálních metod, kterými se dosahuje separace DNA od jiných komponentů (znečišťujících látek, proteinů, buněčných membrán či jiných buněčných organel). Izolace DNA zahrnuje lýzu buněk, rozpuštění DNA, separaci a odstranění makromolekul.

K izolaci DNA byl použit Xtreme DNA kit XME-50 od firmy Isohelix.

- **Materiál**

Reagencie	Objem
○ Lyzační roztok	500 μ l
○ Proteináza	20 μ l
▪ Rekonstrukce proteinázy K:	
• Proteináza K se před použitím rekonstruovala přidáním 110 μ l ddH ₂ O.	
• Po rekonstrukci bylo nutné proteinázu uchovat v teplotě 4°C.	
○ CB pufr (hydrogenuhličitanový pufr)	750 μ l
○ EB pufr (eluční pufr)	100 μ l
○ 70% ethanol	1250 μ l
○ WB pufr (promývací pufr)	750 μ l
▪ Před prvním použitím se do WB pufru přidalo 60 ml absolutního ethanolu.	

Tabulka 1 - Izolace DNA

- Xtreme DNA kolona
- Kolekční zkumavka
- Čistá zkumavka
- 1,5 ml Eppendorf zkumavka určená pro centrifugaci

- **Provedení**

Postup byl proveden podle návodu poskytnutého firmou Isohelix.

DNA se ze vzorku získal lýzou buněk neorganickou metodou. Pro lýzu vzorku bylo do zkumavky přidáno 500 μ l lyzačního roztoku a 20 μ l proteinázy K. Takto připravený roztok se uložil do inkubátoru na dobu alespoň 30 minut. Pro další zpracování bylo nutné vzorek přenést do 5ml zkumavky. Do roztoku se dále postupně přidalo 750 μ l CB pufru. V dalším kroku byl přidán ethanol v objemu 1250 μ l. Pipetou se pak roztok po 750 μ l postupně přenášel do Xtreme DNA kolony uložené ve sběrné zkumavce. Kolonka se zkumavkou se poté centrifugovala při maximální rychlosti (13,4 K rpm, 12000 x g) po dobu 1 minuty. Následovalo přidání 750 μ l WB (promývacího pufru), a následná centrifugace byla nastavena na 1 minutu při maximální rychlosti. Stejným způsobem byl předchozí krok opakován ještě jednou. Kolona byla poté přemístěna do čisté kolekční zkumavky. Ke zbavení DNA od veškerého obsahu ethanolu se kolona nechala centrifugovat při maximální rychlosti po dobu 3 minut. DNA se dále eluovala do čisté 1,5 ml Eppendorf zkumavky přidáním EB pufru v množství 100 μ l a centrifugací při maximální rychlosti po dobu 1 minuty. Získali jsme tak DNA v 100 μ l roztoku připravenou k dalšímu zpracování či k uchování v teplotě -20°C.

4.8. Kontrola produktů izolace

Pro minimalizaci komplikací při další práci se vzorky je nezbytné kvalitu a kvantitu DNA ověřit. Hodnocení lze provést spektrofotometricky nebo elektroforeticky. Kvantita vzorku je hodnocena výtěžností a kvalita je dána mírou čistoty (absence znečišťujících komponentů) vzorku a integrity DNA. Každá z výše zmíněných metod má však své nedostatky, je tedy vhodné obě metody kombinovat.

4.8.1. Gelová agarózová elektroforéza

Elektroforetické metody využívají schopnost záporně nabitých molekul DNA (fosfátové skupiny) pohybovat se v elektrickém poli ve směru od katody k anodě. Jako nosič pro elektroforézu se nejčastěji používá gel tvořený ze sítí molekul agarózy nebo polyakrylamidu. Molekuly DNA se v elektricky nabitém prostředí pohybují dle své velikosti různou rychlostí, kdy velikost fragmentu DNA je nepřímo úměrná jeho pohyblivosti.

- **Materiál:**

Reagencie	Objem
○ Agaróza:	9 g
○ TBE pufr – 10x koncentrovaný (k přípravě agarózového gelu):	300 ml
▪ Tris	30 g
▪ EDTA (0,5M)	12 ml
▪ dH ₂ O	Doplnit do 300 ml
○ Ethidium Bromid (0,5%):	
▪ Ethidium bromid –	0,025 g
▪ Destilovaná voda	5 ml
○ TBE pufr – 0,5x koncentrovaný (pro elektroforézu)	
○ Barva	300 µl
▪ Bromfenolová modř 0,1% 10 mg	100 µg
▪ Glycerol 60% - 6 ml	60 µl
▪ EDTA (0,5M) – 120 µl	1,2 µl
▪ Deionizovaná voda – 3,88 ml	38,8 µl
○ Hmotnostní marker 100 bp	5 µl
▪ Marker	1 µl
▪ Pufr	2 µl
▪ Destilovaná voda	2 µl

Tabulka 2 - Gelová elektroforéza na agaru

- **Provedení:**

Pro kontrolu produktů izolace byla použita horizontální elektroforetická metoda na 1% agarózovém gelu, jehož příprava spočívá ve smíchání agarózy s 10x koncentrovaným TBE pufrům v poměru 1:100. Agaróza se nechala rozpustit v mikrovlnné troubě za občasného míchání. Do rozpuštěného gelu byl následně přidán Ethidium-bromid k vizualizaci pod UV světlem. Před tuhnutím se do gelu umístil elektroforetický hřeben k vytvoření jamek pro pozdější nanášení vzorků. Po zchladnutí a ztuhnutí se gel vyjmul z formy a umístil se do elektroforetické vany tak, že byl celý ponořen v 0,5x koncentrovaném TBE pufru.

Vzorky se před elektroforézou smísily s roztokem bromfenolové modři v poměru 4:1. Vzorky se postupně nanasly do jamek, první z nichž je vyhrazena pro hmotnostní marker 100bp pro odhad velikosti fragmentů DNA. Elektroforetická vana byla poté napojena na elektrický proud o napětí 60 V.

Po 30 až 60minutové elektroforéze lze gel se vzorky hodnotit na UV-transluminátoru.

4.8.2. Spektrofotometrická kontrola DNA na nanodropu

Nanodrop je přístroj, který využívá spektrofotometrickou metodu ke kvantifikaci nukleových kyselin nebo bílkovin v 1 – 2 μ l vzorku. Spektrofotometrie spočívá v závislosti mezi koncentrací vzorku a mírou jeho absorbance při určitých vlnových délkách. Nukleové kyseliny většinou absorbují nejvíce světla ve vlnové délce 260 nm.

- **Materiál**

- EB pufr jako blank
- PCR produkt

- **Přístrojové vybavení:**

- Přístroj Thermo Scientific™ nanodrop 2000/2000c Spectrophotometer
- Software Nucleic Acid

- **Provedení:**

Pipetou se na optickou měřicí plochu spektrofotometru nejdříve nanasle EB pufr, jež byl použit v posledním kroku při izolaci DNA, jako blank neboli pozadí. Stažením páky směrem k měřicí ploše se mezi oběma povrchy vytvořil sloupec vzorku optimální pro měření. V aplikaci se poté spustilo měření blanku. Před každým novým měřením je nutno měřicí povrch vyčistit ddH₂O. Měření koncentrace DNA ve vzorku probíhalo podobným způsobem jen s tím rozdílem, že se v aplikaci spustilo místo měření blanku měření vzorku. Změřená koncentrace DNA byla následně zobrazena na obrazovce.

4.8.3. Výsledek kontroly

Z výsledků získaných elektroforézou a spektrofotometrií 100 vzorků jsme vyřadili 6, které vykazovaly nejslabší koncentraci DNA v obou metodách měření.

4.9. Analýza SNPs

4.9.1. Metoda PCR

Jde o enzymatickou reakci, která se cyklicky opakuje, a za jejíž pomoci se amplifikuje úsek DNA definovaný a ohraničený příslušnými primery (Tabulka 4) při specifických teplotách v termocykléru. Reakce se skládá ze tří kroků:

- 1) Denaturace DNA se děje při teplotě mezi 92°C a 98°C po dobu 3 minut při prvním cyklu nebo pod 1 minutu při běžném cyklu. Cílem tohoto kroku je zrušení prostorové konformace DNA a rozpletení jejího dvouvlákna. Úplné rozpletení vláken je předpokladem pro další krok – annealing, neboť neúplně rozpletená vlákna se mohou při snížené teplotě znovu spojit a znemožnit tak nasednutí primerů. Teplota a doba trvání se odvíjí od délky a sekvence templátu.
- 2) Annealing (hybridizace) je proces nasedání primerů na komplementární sekvenci DNA vlákna. Potřebná teplota v tomto kroku je pro každý primer charakteristická a je určena právě jeho sekvencí a délkou, pohybuje se mezi 40°C a 65°C. Primery by měly být navrhnuty tak, aby měly stejnou nebo podobnou teplotu hybridizace.
- 3) Syntéza DNA je posledním krokem cyklu, během kterého se pomocí termostabilní DNA polymerázy syntetizuje komplementární vlákno DNA v úseku ohraničeném primery. Tento krok probíhá při teplotě 72°C, která je pro používanou Taq polymerázu optimální.

Sledovaný fragment se tak během přibližně 30 cyklů exponenciálně zvyšuje.

- Materiál

Master mix:	
• Roztoky	Objem [μl]
○ Voda	16,45 – 18,45
○ Pufr dream Taq (10x koncentrovaný)	2,5
○ MgCl ₂ (25mM)	1,5
○ dNTP (10nM)	0,5
○ Primer F (forward) (50 nebo 10 pM)	1
○ Primer R (reverse) (50 nebo 10 pM)	1
○ Polymeráza dream Taq	0,05
DNA:	1 – 5 μl

Tabulka 3 - PCR reakční směs

- **Přístrojové vybavení:**
 - o PCR termocyklér T100 Thermal Cycler od společnosti Bio-rad
- **Provedení**

Příprava reakční směsi probíhala v UV dekontaminačních boxech, které umožňují dezinfekci pracovních ploch uvnitř boxů před prací i dezinfekci vzduchu během práce UV světlem a cirkulátorem. Se složkami master mixu a s DNA se pracuje odděleně k zabránění kontaminace cizí nukleovou kyselinou.

Master mix pro všechny vzorky se připravil z destilované vody, dream Taq pufru, hořečnatých iontů, deoxyribonukleotidtrifosfátů, primerů Forward, primerů Reverse a DNA polymerázy (Taq). Master mix se následně rovnoměrně rozpipetoval automatickou pipetou do jamek PCR destičky v objemu 20 – 24 µl na jeden vzorek podle metodiky.

Do jamek se k mixu dle již zavedené metodiky přidalo 1 – 5 µl DNA, přičemž poslední jamka 11. a 12. řady (pozice H11 a H12) sloužily jako negativní kontroly, do nichž se tedy DNA nepřidávala. Jamky se pak zakáply silikonovým gelem a destička se přelepila fólií k zabránění vypařování a kontaminace vzorků.

Destička s připravenou PCR směsí se vložila do termocykléru, na kterém se zvolil příslušný program se specifickou teplotou pro dané primery.

Program pro většinu analýz trval 34 cyklů s počáteční teplotou k denaturaci 95°C po dobu 3 minut, následována hybridizací při 57°- 69°C po dobu 30 sekund a syntéza DNA v posledním kroku probíhala 1 minutu při teplotě 72°C.

Gen/ SNP	oligonukleotidy	PCR produkt	Enzym	Restrikční fragmenty	Allela
rs17817449 (FTO)	5' GGG AAG AGG AGG AGA TTG TGT AAC TGG 3' 5' GAA GCC CTG AGA AGT TTA GAG TAA ATT GGG 3'	198 bp	AlwNI	198 bp	G
				99 bp + 99 bp	T
rs7903146 (TCF7L2)	5' GAA CAA TTA GAG AGC TAA GCA CTT TTT AGG 3' 5' TGT CCA GGG CCC CTC TAA CCT T 3'	155 bp	RsaI	155 bp	T
				123 bp + 32 bp	C
rs17782313 (MC4R)	5' AAG TTC TAC CTA CCA TGT TCT TGG 3' 5' TTC CCC CTG AAG CTT TTC TTG TCA TTT CCT A 3'	137 bp	BclI	136 bp	C
				107 bp + 30 bp	T
rs1229984 (ADH1B)	5' AGG GGC TTT AGA CTG AAT AAC CTT GG 3' 5' AAT CCT GGA TGG TGA ACC ACA CG 3'	92 bp	Hin6I	92 bp	A
				65 bp + 27 bp	G
rs1799945 (HFE H63D)	5' ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC 3' 5' GCC ACA TCT GGC TTG AAA TT 3'	208	BclI	208 bp	G
				138 bp + 70 bp	C
rs1800562 (HFE C282Y)	5' AAC CTT GGC TGT ACC CCC TG 3' 5' GCC CAC CCC CTA ACA AAG AG 3'	191 bp	RsaI	191 bp	G
				162 bp + 29 bp	A
Rs4988235 (LCT)	5' GCT GGC AAT ACA GAT AAG ATA ATG GA 3' 5' CTG CTT TGG TTG AAG CGA AGA T 3'	201 bp	HnfI	201 bp	C
				177 bp + 24 bp	T

Tabulka 4 - PCR-RFLP

4.9.2. Kontrola produktů PCR

Úspěšnost amplifikace - produkty PCR - se kontrolovaly na 3% agarózovém gelu. Viz výše s rozdílem v poměru agarózy : pufru = 3:100. Kontrolou produktů se ověřil úspěch proběhlé PCR reakce či správnost jednotlivých kroků při přípravě reakční směsi před dalším krokem.

4.9.3. RFLP – restrikční štěpení produktů

Restrikční analýzou specifickými enzymy - endonukleázami (restriktázami) se rozpozná a štěpí DNA, která obsahuje přesně definovanou sekvenci nukleotidů.

- **Materiál**

<i>Reagencie</i>	<i>Objemy</i>
dH ₂ O	7,5 – 9,6 μl
Reakční pufr	2 μl
Enzym restriktáza (viz tab. 1)	0,1 – 0,5 μl
PCR produkt	10 μl

Tabulka 5 - Reakční směs pro RFLP

- **Provedení:**

K přípravě mixu pro sto vzorků se smíchala 750 μl (až 960 μl dle metody) vody s 200 μl reakčního pufru (s výjimkou štěpení MC4R enzymem BclI, kde byla použita jen voda a restriktáza) a 10 μl (až 50 μl dle metody) příslušného enzymu – restriktázy. Takto připravený mix se po 10 μl rozpipetoval do jednotlivých jamek destičky určené k RFLP nebo do destičky určené pro PCR (u MC4R a HFE-H63D s RFLP enzymem BclI).

K mixu v jamkách se následně přidalo 10 μl PCR produktu.

Vzorky se poté zakryly víkem a inkubovaly při specifické teplotě optimální pro aktivitu daného enzymu různě dlouhou dobu buď v termostatu při 37°C ve vlhkém prostředí přes noc nebo v termocykléru při 55°C na 4 hodiny (u štěpení enzymem BclI).

4.9.4. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Analýza získaných produktů po RFLP se provádí elektroforetickou separací na polyakrylamidovém gelu, který je vhodnější zejména pro rozdělování kratších fragmentů. Koncentrace gelu se zvolí podle délky fragmentů.

○ **Materiál**

Reagencie	Objem
- Silan (pro lepší přilnutí gelu k desce)	
○ Absolutní etanol	99 ml
○ Kyselina octová (99,5%)	0,5 ml
○ Methacryloxy-propyl-trimethoxy-silan	0,5 ml
- Složení polyakrylamidového gelu pro 4 desky	
○ Destilovaná voda	124,5 ml
○ 10x koncentrovaný TBE pufr	10,5 ml
○ Akrylamid (30%) mix 29:1	60 ml
○ Tetramethylethylendiamin (jako katalyzátor)	195 μ l
○ Peroxydisíran amonný (iniciátor)	3 x 390 μ l
- Složení barveného produktu RFLP	
○ Barva (pro zvýšení hustoty vzorky a lepší možnost sledování pohybu vzorku během elektroforézy) 0,02%	2,3 μ l
▪ Modrá	
• Bromfenolová modř	4 mg
• Glycerol 60%	6 ml
• EDTA (0,5M)	20 ml
• Destilovaná voda	Doplnit do 100 ml
▪ Oranžová	
• Oranž G	2 mg
• 0,5M EDTA	20 ml
• Glycerol	8 ml
• Destilovaná voda	Doplnit do 100 ml
○ Produkty RFLP	7 μ l
- Produkt PCR jako kontrola	7 μ l
- 0,5x koncentrovaný TBE pufr	

Tabulka 6 - Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

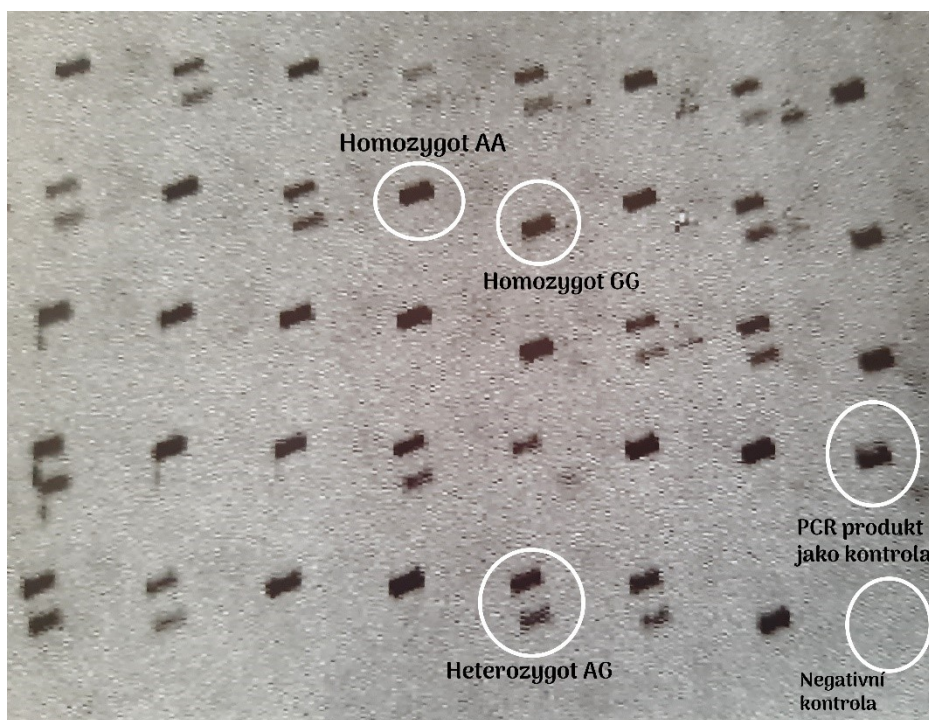
- **Provedení:**

Skleněná deska se pokryla silanem, který umožňuje snazšímu přilnutí gelu. Silan se musel rozetřít do sucha a nesměl přijít do kontaktu s jinými povrchy či látkami.

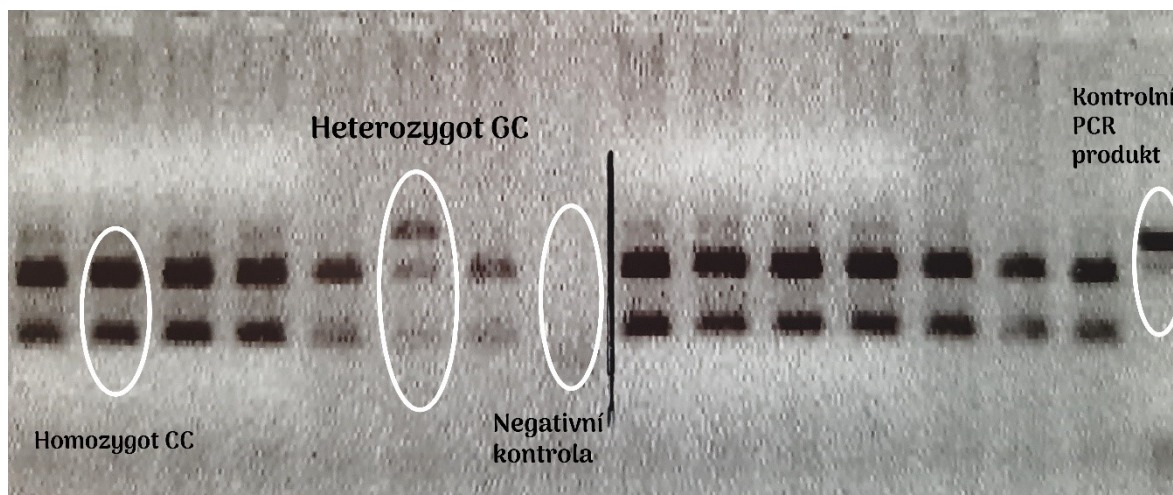
Polyakrylamidový gel se připravil smícháním vody, TBE pufru, akrylamidu, TEMED a peroxydisíranu amonného a nalil se na připravené desky s hřebínky. Na nalitý gel se opatrně položila skleněná deska stranou natřenou silanem dolů. Gel se následně nechal polymerovat alespoň 30 minut.

Aby bylo možné produkty na gelu později vizualizovat na UV-transluminátoru, bylo nutné polyakrylamidové desky před elektroforézou ponořit na 3 minuty do roztoku 0,5x koncentrovaného TBE pufru s ethidium-bromidem.

K 7 μ l produktů se přimíchala nanášecí barva (bromfenolová modř nebo oranž G) rozpuštěná v glycerolu v objemu 3 μ l. Směs se následně nanasla do jamek v polyakrylamidovém gelu ponořeném do 0,5x koncentrovaného TBE pufru v elektroforetické vaničce. Místo první negativní kontroly se do poslední jamky předposlední řady (pozice H11) nanasla PCR produkt, který sloužil jako pozitivní kontrola. Elektroforéza se nechala běžet 65 – 90 minut pod proudem o napětí 130 V. Po elektroforéze se výsledek podobně jako v případě agarózového gelu nechal zviditelnit na UV-transluminátoru. Na gelu bylo možné odečíst, zda je jedinec heterozygot či homozygot pro daný polymorfismus. (Obrázek 10, Obrázek 11)



Obrázek 10 - Výsledek PCR-RFLP na polyakrylamidovém gelu pro polymorfismus v genu *ADH1B*



Obrázek 11 - Výsledek PCR-RFLP na agarózovém gelu pro HFE-H63D

4.9.5. Real-time PCR pro gen ApoE

Real-time PCR je metoda, která umožňuje amplifikaci a zároveň i kvantifikaci produktu.

Je založena na principu klasické PCR, ale je pro ni charakteristické použití fluorescenčních sond, díky kterým lze detekovat PCR produkty v reálném čase (= real time). Sonden o specifické sekvenci se naváží na DNA a tím umožňuje jejich fluorescenční reportér emisi fluorescenčního záření. Míra detekované fluorescence je pak přímo úměrná množství amplifikovaného PCR produktu.

- **Materiál:**

Reakční směs:	Objem
- Master mix Taqpath ProAmp	5 μ l
o 20x assay 1 (VIC/FAM)	0,5 μ l
▪ Assay je nutno před použitím naředit TE pufrem	
o PCR voda	3,5 μ l
- DNA	1 μ l

Tabulka 7 - Reakční směs pro real-time PCR

o **Přístrojové vybavení:**

- QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System
- Software Quant Studio 6

- **Provedení:**

Příprava reakční směsi pro RT-PCR podobně jako v případě PCR probíhala v PCR dekontaminačních boxech a spočívala ve smíchání 500 μ l (objem pro 100

vzorků) Master mixu TaqPath ProAmp se 350 µl PCR vody a 50 µl 20x naředěného assaye s barvami VIC a FAM. Směs se následně rozpipetovala po 9 µl automatickou pipetou do jednotlivých jamek destičky MicroAmp určené pro Real-time PCR. Osmikanálovou pipetou se v druhém dekontaminačním boxu přidala do směsi DNA v objemu 1 µl. Destička se následně přelepila optickou fólií a nechala se centrifugovat při rychlosti 1500 ot./min po dobu 5 minut. Destička byla po stočení uložena do Real-time PCR přístroje a v software Quant Studio 6 se zvolenými specifikami (velikost destičky: 96jamková, typ: genotypizace, reagentie: TaqMan, správně zvolené barvy podle výrobce – v tomto případě barvy VIC a FAM, správné označení vzorků a kontrol, správný objem směsi – 10 µl,...) se spustil start. Reakce probíhala následovně:

- Fáze „Pre-read“ při 60°C po dobu 30 sekund
- Fáze „Hold“ při 95°C po dobu 5 minut k aktivaci polymerázy
- Vlastní PCR (40 cyklů)
 - 15 sekund při 95°C – proces denaturace
 - 1 minuta při 60°C – proces hybridizace a extenze
- Fáze „Post-Read“ při 60°C po dobu 30 sekund

Výsledky reakce byly programem vyhodnoceny a znázorněny ve spojnicových a bodových grafech, na kterých bylo možné odlišit heterozygoty od homozygotů pro normální i minoritní alelu.

Metodou Real-time PCR jsme genotypovali SNPs genu ApoE se dvěma sadami, jednou pro pozici 112 (rs7412) a podruhé pro pozici 158 (rs429358).

4.10. Statistické zpracování dat

Výsledky analytické části práce byly statisticky hodnoceny pomocí statistických nástrojů dostupných na internetu či v programu Microsoft Excel.

4.10.1. Hardy-Weinbergova rovnováha

Hardy-Weinbergův (HW) princip spočívá v korelaci mezi alelovou četností a genotypovou četností v jedné populaci. Pro Hardy-Weinbergův princip byl navržen velmi jednoduchý model populace, kde není přítomen mutační, selekční ani migrační tlak. HW princip je však v jednoduchých výpočtech frekvencí alel a genotypů běžné lidské populace také aplikovatelný.

Hardy-Weinbergova rovnováha vyjadřuje ustálení alelových četností, které se v další generaci nebudou měnit, podobně jako stálost genotypových četností v jedné populaci. Při výskytu pouze dvou alel v populaci můžeme četnosti homozygotů a heterozygotů vyjádřit pomocí vzorce: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, kdy p^2 představuje počet dominantních homozygotů, $2pq$ počet heterozygotů a q^2 počet recesivních homozygotů.

Pomocí HW rovnováhy můžeme zjistit odchylky od modelové populace, či v praktických případech abnormality při výběru výzkumného souboru. Zásadní rozdíly od rovnováhy mohou poukázat i na metodický problém s genotypizací.

4.10.2. Chí-kvadrát (X^2) test nezávislosti

Tento typ X^2 testu se používá k ověření hypotéz o vztahu dvou souborů hodnot. Rozeznává se zde nulová a alternativní hypotéza, kdy nulová hypotéza je taková, která popírá rozdíl mezi sledovanými skupinami, zatímco alternativní hypotéza je ta, která tvrzení nulové hypotézy vyvrátí. Na základě pozorovaných hodnot/výsledků můžeme pak v závěru nulovou hypotézu buď přijmout nebo zamítnout. Při testování však nelze eliminovat chyby. Existují dva základní typy chyb, jedny jsou falešně pozitivní a druhé falešně negativní. Pro stanovení nejvyšší možné pravděpodobnosti chyb 1. typu zvolíme vhodnou hladinu významnosti, nejčastější však 0,5.

(Social Science Statistics, 2023)

5. Výsledky

5.1. Úspěšnost genotypizace

Z celkového počtu 94 vzorků DNA získaných od vietnamských dobrovolníků jsme genotypizovali celkem 9 variant nutrigeneticky významných genů. Úspěšnost genotypizace se u sledovaných variant pohybovala mezi 75,5–100 % (Tabulka 8). U vzorků, kterým nebylo možné přiřadit genotyp v rámci první genotypizace, jsme analýzu ještě jednou opakovali. Za neúspěšné byly považovány vzorky po dvou neúspěšných pokusech genotypizace.

Geny/rs	N	%
<i>FTO - rs17817449</i>	84	89,4%
<i>TCF7L2 - rs7903146</i>	77	81,9%
<i>MC4R - rs17782313</i>	83	88,3%
<i>HFE-C282Y - rs1800562</i>	71	75,5%
<i>HFE-H63D - rs1800730</i>	87	92,6%
<i>ADH1B - rs1229984</i>	88	93,6%
<i>LCT - rs4988235</i>	79	84,0%
<i>APOE - rs7412 a rs249358</i>	94	100,0%

Tabulka 8 - Úspěšnost genotypizace

5.2. Hardy-Weinbergova rovnováha

U variant, které nebyly monoforní (počet homozygotů a heterozygotů > 0), jsme ověřili rozložení genotypů v populaci podle Hardy-Weinbergova zákona. Výsledky ukazují, že frekvence genotypů odpovídá HW rovnováze s hodnotou $P > .05$, což potvrzuje správnost metodiky a dále dokazuje, že vybraná skupina dobrovolníků odpovídá normálnímu rozložení ideální populace a že výsledky nejsou zkresleny například zahrnutím pokrevně příbuzných jedinců do výzkumu.

5.3.Frekvence genotypů

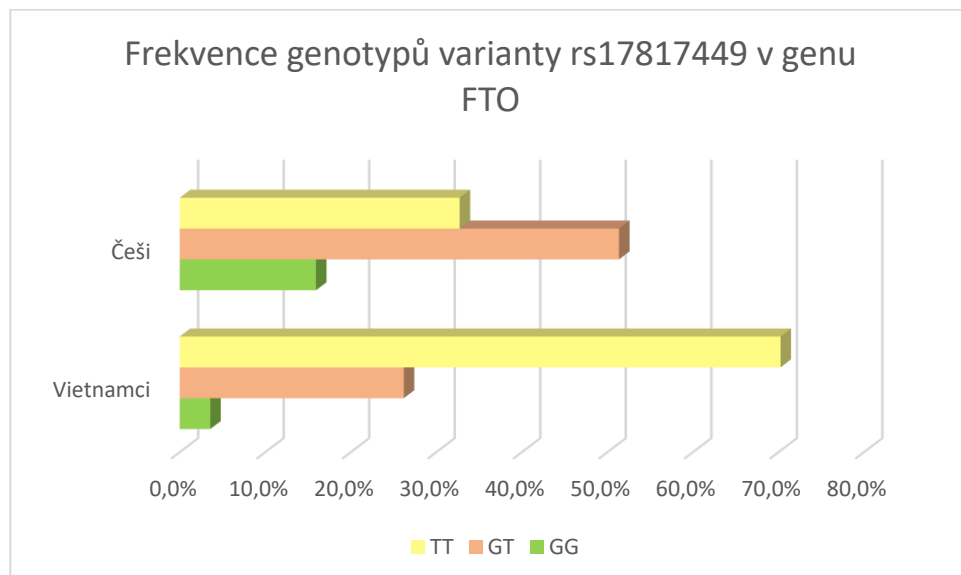
Z předkládaných výsledků genotypizace a dostupných dat z databáze genetické laboratoře IKEM jsme porovnali celkem 9 polymorfismů v osmi genech:

5.3.1. Frekvence genotypů varianty rs17817449

V případě genu FTO je patrná ve vietnamské populaci výrazně nižší frekvence genotypů obsahujících alelu G ($P < .00001$), která je v naprosté většině populací spojena s vyšším rizikem obezity a s vyššími hodnotami BMI.

Genotypy varianty <i>rs17817449</i> (<i>FTO</i>)	Česká populace		Vietnamská populace		P*
	N	%	N	%	
GG	426	17,3 %	3	3,6 %	<i>GG + GT vs TT</i> $< .00001$
GT	1224	49,6 %	22	26,2 %	
TT	817	33,1 %	59	70,2 %	
G	2076	42,1 %	28	16,7 %	$< .00001$
T	2858	57,9 %	140	83,3 %	

Tabulka 9 - Genotypy varianty rs17817449 v genu FTO



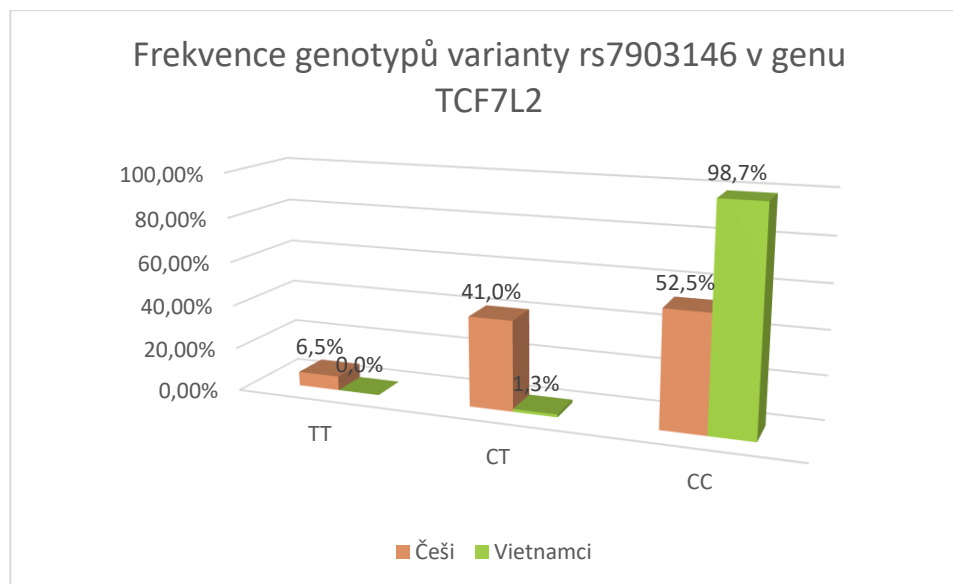
Graf 1 – Frekvence genotypů varianty rs17817449 v genu FTO

5.3.2. Frekvence genotypů varianty rs7903146

U varianty rs7903146 jsme také našli signifikantně nižší výskyt alely T ($P < .00001$), která je riziková pro vznik DM 2. typu. Rozdíl byl extrémní, vietnamská populace má tuto frekvenci cca třicetkrát nižší.

Genotypy varianty <i>rs7903146</i> (<i>TCF7L2</i>)	Česká populace		Vietnamská populace		P*
	N	%	N	%	
TT	165	6,5 %	0	0 %	<i>TT + CT vs CC</i> $< .00001$
CT	1042	41,0 %	1	1,3 %	
CC	1336	52,5 %	76	98,7 %	
T	1372	27,0 %	1	0,6 %	$< .00001$
C	3714	73,0 %	153	99,4 %	

Tabulka 10 - Genotypy varianty rs7903146 v genu *TCF7L2*



Graf 2 - Frekvence genotypů varianty rs7903146 v genu *TCF7L2*

5.3.3. Frekvence genotypů varianty rs17782313

Rozdíl v rozložení alel pro variantu rs17782313 genu MC4R se v české a vietnamské populaci jeví jako nevýznamný. Frekvence výskytu alely C, která je spojena s vyšším BMI a s vyšším rizikem obezity, byla kolem 22 % v obou populacích.

Genotypy varianty <i>rs17782313</i> (<i>MC4R</i>)	Česká populace		Vietnamská populace		P*
	N	%	N	%	
CC	128	5,0 %	3	3,6 %	CC + CT vs TT = .88
CT	910	35,6 %	30	36,1 %	
TT	1521	59,4 %	50	60,2 %	
C	1166	22,8 %	36	21,7 %	= .74
T	3952	77,2 %	130	78,3 %	

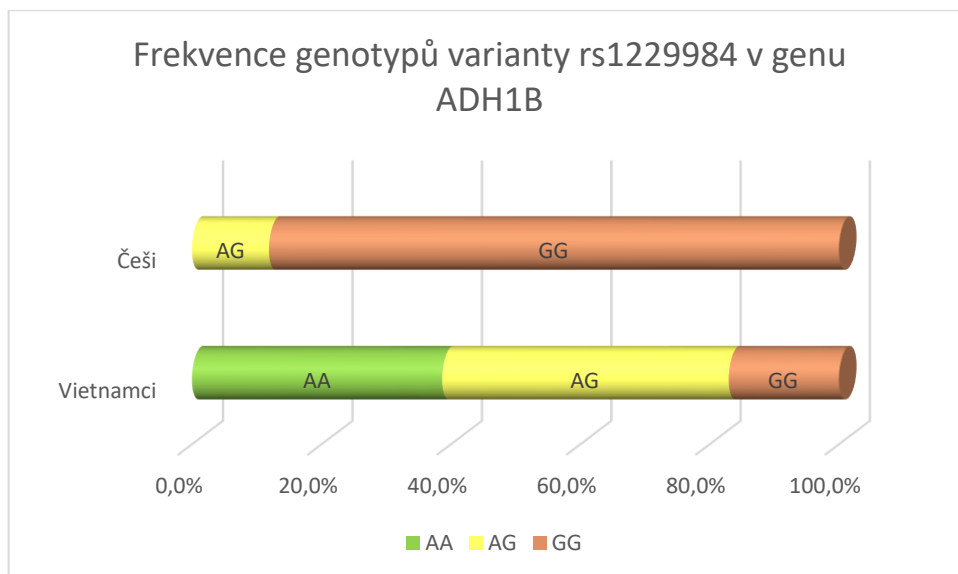
Tabulka 11 - Genotypy varianty rs17782313 v genu MC4R

5.3.4. Frekvence genotypů varianty rs1229984

Výskyt alely A varianty rs1229984 v genu ADH1B, která je spojena s horšími příznaky kocoviny, a tedy i možným nižším rizikem alkoholismu, je významně vyšší ve vietnamské populaci než mezi Čechy.

Genotypy varianty <i>rs1229984</i> (<i>ADH1B</i>)	Česká populace		Vietnamská populace		P*
	N	%	N	%	
AA	7	0,3 %	34	38,6 %	AA + AG vs. GG < .0001
AG	266	10,4 %	39	44,3 %	
GG	2286	89,3 %	15	17,1 %	
A	280	5,5 %	107	60,8 %	< .0001
G	4838	94,5 %	69	39,2 %	

Tabulka 12 - Genotypy varianty rs1229984 v genu ADH1B



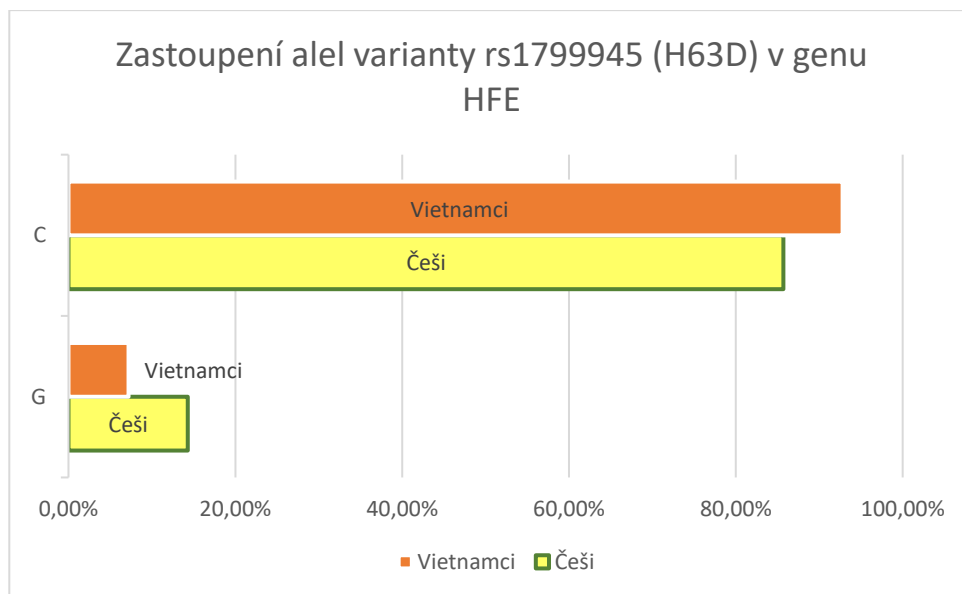
Graf 3 - Frekvence genotypů varianty rs1229984 v genu ADH1B

5.3.5. Frekvence genotypů varianty rs1799945

Ve vietnamské populaci je u varianty rs1799945 (H63D) v genu HFE nižší frekvence alely G ($P = .0072$), která může za vyšší riziko mírné formy hereditární hemochromatózy.

Genotypy varianty <i>rs1799945</i> (HFE H63D)	Česká populace		Vietnamská populace		P*
	N	%	N	%	
GG	51	2,0 %	1	1,1 %	<i>GG + CG vs CC</i> $< .005$
CG	629	24,6 %	11	12,2 %	
CC	1875	73,4 %	78	86,7 %	
G	731	14,3 %	13	7,2 %	$< .007$
C	4378	85,7 %	167	92,8 %	

Tabulka 13 - Genotypy varianty rs1799945 (H63D) v genu HFE



Graf 4 - Zastoupení rizikové alely G varianty rs1799945 (H63D) v genu HFE

5.3.6. Frekvence genotypů varianty rs1800562

Výskyt alel varianty rs1800562 (C282Y) genu HFE v české a vietnamské populaci je statisticky srovnatelný ($P = .13$). Výskyt homozygotů pro alelu A, která je riziková pro vznik vážné formy hemochromatózy, je v obou populacích velmi nízký. To může být příčinou, že ani cca 4x vyšší frekvence v české populaci není statisticky rozpoznána jako významně vyšší.

Genotypy varianty <i>rs1800562</i> (HFE C282Y)	Česká populace		Vietnamská populace		P*
	N	%	N	%	
AA	3	0,1 %	0	0 %	AA + AG vs GG = .15
AG	124	5,4 %	1	1,4 %	
GG	2286	94,5 %	70	98,6 %	
A	130	2,8 %	1	0,7 %	= .13
G	4484	97,2 %	141	99,3 %	

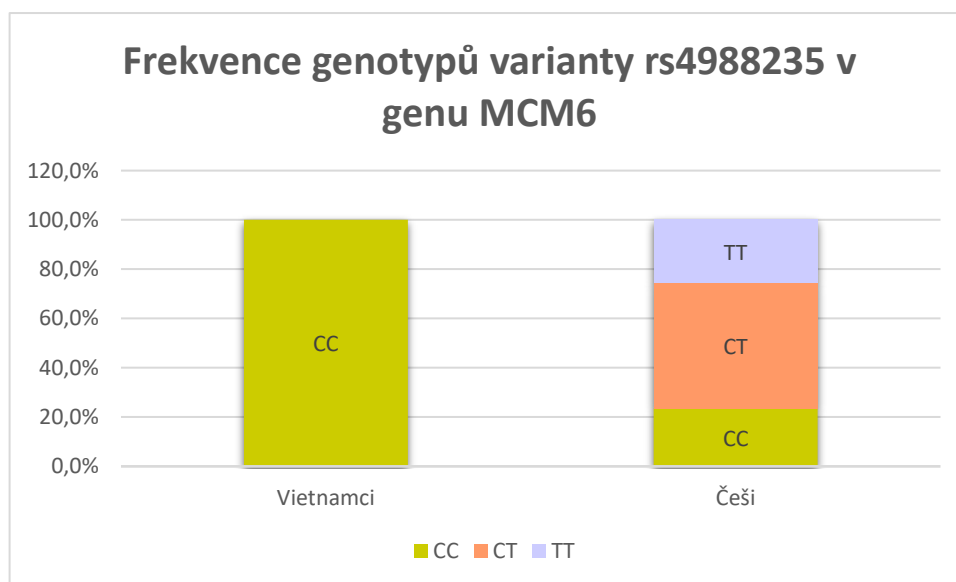
Tabulka 14 - Genotypy varianty rs1800562 (C282Y) v genu HFE

5.3.7. Frekvence genotypů varianty rs4988235

U varianty rs4988235 je výskyt alely T, která je spojena s možností laktázové perzistence, nulový. Hodnoty proto nebylo možné zvolenou metodou statisticky porovnat. Výsledky však jasně ukazují rozdíl ve schopnosti trávit mléčný cukr – v české populaci se tato schopnost vyskytuje u většiny populace, kdežto v populaci vietnamské je tato schopnost nulová.

Genotypy varianty <i>rs4988235</i> (<i>MCM6</i>)	Česká populace		Vietnamská populace		P*
	N	%	N	%	
CC	68	23,6 %	70	100 %	<i>nelze vyhodnotit</i>
CT	146	50,7 %	0	0 %	
TT	74	25,7 %	0	0 %	
C	282	49 %	158	100 %	<i>nelze vyhodnotit</i>
T	294	51,0 %	0	0 %	

Tabulka 15 - Genotypy varianty rs4988235 v genu MCM6



Graf 5 - Frekvence genotypů varianty rs498235 v genu MCM6

5.3.8. Frekvence genotypů v genu ApoE (variant rs7412 a rs249358)

V případě genu pro apolipoprotein E jsme porovnali homozygotní a heterozygotní konstituce i frekvence jednotlivých izoform e2, e3 a e4. Statisticky významný rozdíl jsme našli jen ve frekvenci izoformy e4 (zodpovědné za vyšší cholesterolémii), která je mírně častější ve vietnamské populaci ($P = .03$). V porovnání zahrnujícím zároveň i protektivní genotypy s alelou e2 jsme významný rozdíl nenalezli.

Genotypy v genu ApoE	Česká populace		Vietnamská populace		P*
	N	%	N	%	
e2/e2	20	0,8 %	1	1 %	+2 vs. 33 vs. +4 = .47
e3/e2	324	12,4 %	10	10,6 %	
e3/e3	1787	68,6 %	60	63,8 %	
e4/e2	35	1,3 %	3	3,2 %	
e4/e3	406	15,6 %	20	21,3 %	
e4/e4	33	1,3 %	0	0 %	
e2	399	7,7 %	15	7,9 %	= .71
e3	4304	82,6 %	150	79,8 %	
e4	507	9,7 %	23	12,2 %	= .03

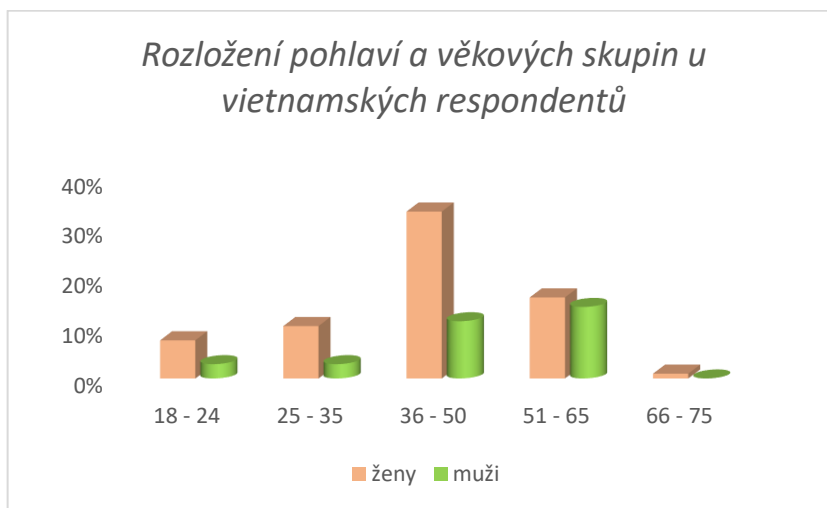
Tabulka 16 - Genotypy v genu ApoE

5.4. Dotazníkové šetření

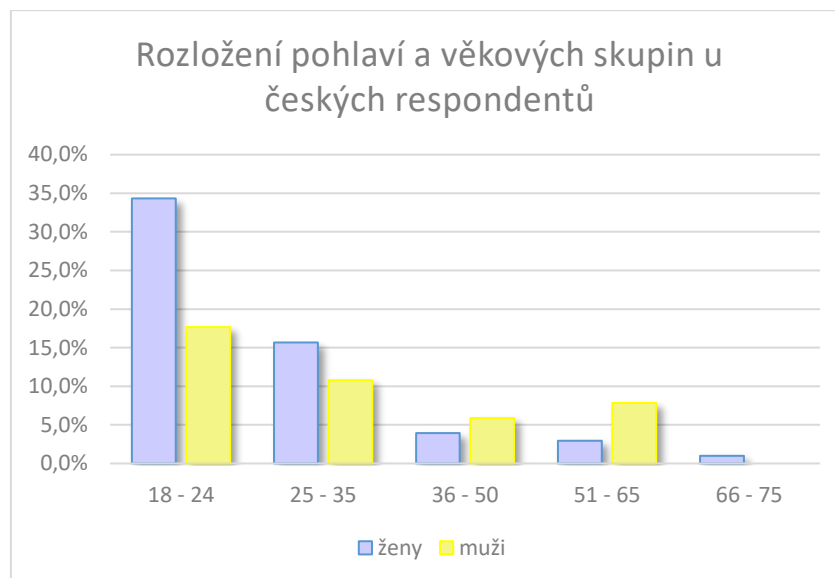
Cílem dotazníkového šetření bylo mapovat jídelní zvyklosti dobrovolníků vietnamského původu a vztahovat získaná data k závěrům vyplývajícím z genetických analýz. Dotazník byl sestaven z celkem 40 otázek a množství získaných údajů bylo větší, než je pro účel této práce nutné. Důraz byl proto kladen zejména na otázky, které mají souvislost s vyšetřenými geny. Jde například o otázky týkající se konzumace mléka a mléčných výrobků, která má přímou návaznost na frekvenci výskytu alel varianty rs4988235 pro laktózovou intoleranci a dále otázky týkající se frekvence konzumace alkoholických nápojů a jejich objemu, které by měly korelovat s výskytem alel varianty rs1229984 v genu ADH1B pro alkohol-dehydrogenázu. Údaje byly získány od dobrovolníků, kterým byl odebrán i vzorek buněk stěrem bukalní sliznice, a z dat získaných z mé bakalářské práce s názvem „Stravovací zvyklosti a životní styl ve vietnamské komunitě v ČR v porovnání s populací Vietnamu a rodilými Čechy“ (Vzor dotazníku viz přílohy).

5.4.1. Charakteristiky skupin respondentů

Ve skupině vietnamských respondentů se vyskytovalo výrazně více jedinců ve věku 36–50 let, zatímco mezi českými respondenty měla nejvyšší zastoupení věková skupina 18–24 let. V obou skupinách se šetření zúčastnilo více žen než mužů. Ve vietnamské skupině dokonce ve všech věkových skupinách.



Graf 6 - Rozložení pohlaví a věkových skupin u vietnamských respondentů



Graf 7 - Rozložení pohlaví a věkových skupin u českých respondentů

5.4.2. Výskyt metabolických civilizačních onemocnění

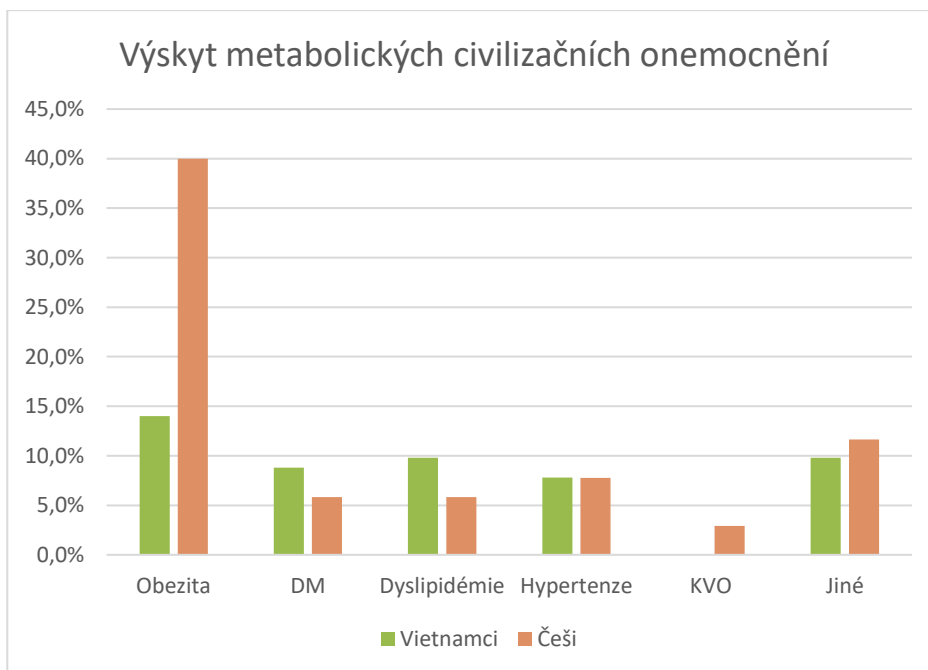
Údaje o výskytu metabolických civilizačních chorob byly získány pouze formou odpovědí, nebyly změřeny žádné antropometrické či jiné laboratorní hodnoty. Hodnoty BMI byly vypočítány z údajů o tělesné výšce a hmotnosti respondentů a následně seřazeny do odpovídajících skupin:

- < 18,5.....podvýživa
- 18,5 – 24,9.....norma
- 25 – 29,9.....nadváha
- > 30obezita

Výskyt obezity a nadváhy je 2x vyšší v české skupině.

	Vietnamci	%	Češi	%
Obezita a nadváha	14	14 %	41	40 %
DM	9	8,8 %	6	5,8 %
Dyslipidémie	10	9,8 %	6	5,8 %
Hypertenze	8	7,8 %	8	7,8 %
KVO	0	0	3	2,9 %
Jiné	10	9,8 %	12	11,7 %

Tabulka 17 - Výskyt metabolických civilizačních onemocnění



Graf 8 - Výskyt metabolických civilizačních onemocnění

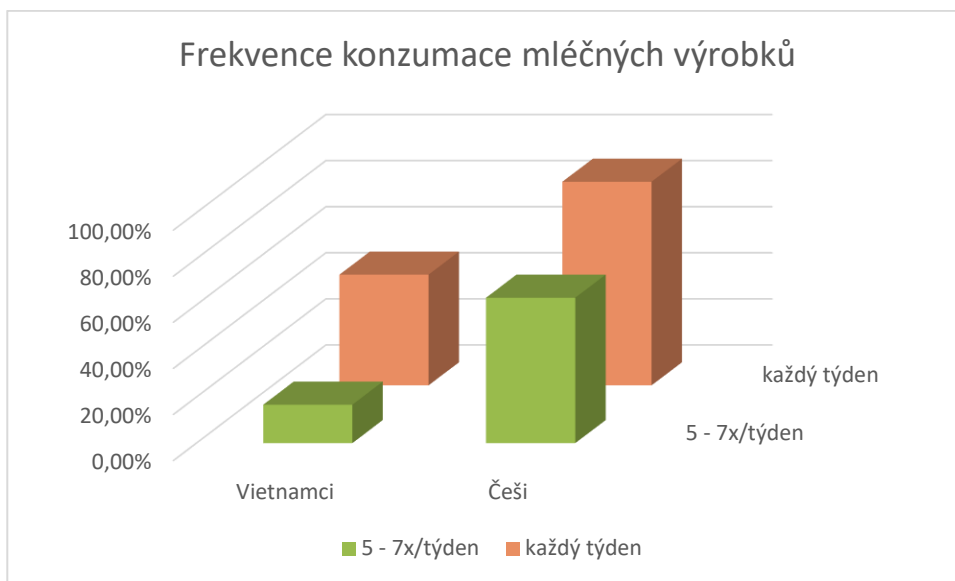
5.4.3. Frekvence konzumace mléčných výrobků

Konzumace mléka a mléčných výrobků byla hodnocena podle údajů ve frekvenční tabulce s možnostmi volby, jak jsou uvedeny v tabulce 18:

	Vietnamci	%	Češi	%
Každý den	11	10,8%	32	31,1%
4 - 6x/ týden	6	5,9%	33	32%
2 - 3x/ týden	19	18,6%	23	22,3%
1x/týden	13	12,8%	3	2,9%
1 - 2x/ měsíc	5	4,9%	3	2,9%
Málokdy	21	20,6%	4	3,9%
Nikdy	26	25,5%	5	4,9%

Tabulka 18 - Frekvence konzumace mléčných výrobků

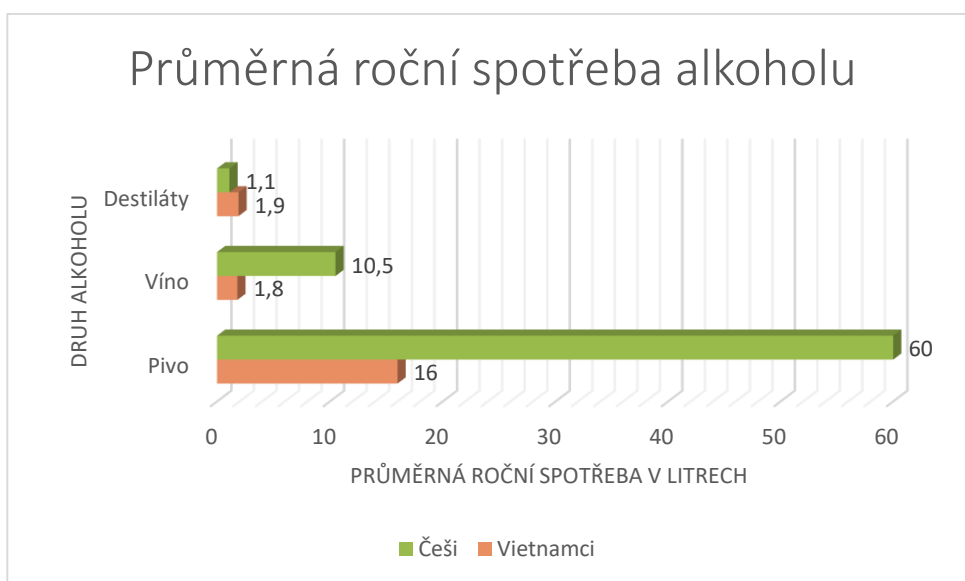
Pro přehlednost jsou údaje o frekvenci konzumace mléka v týdenním intervalu zpracovány do grafické podoby:



Graf 9 - Frekvence konzumace mléčných výrobků v týdenním intervalu

5.4.4. Spotřeba alkoholu

Průměrná roční spotřeba alkoholických nápojů byla vypočítána dle údajů o frekvenci konzumace alkoholu v týdenním, měsíčním nebo ročním intervalu a z údajů o objemu vypitého nápoje v jedné dávce. Výrazně vyšší spotřeba piva a vína byla pozorována ve skupině českých respondentů. Naopak mírně vyšší průměrná spotřeba destilátů byla vyšší ve skupině Vietnamců.



Graf 10 - Průměrná roční spotřeba alkoholu

6. Diskuse

Pro analýzu genotypů ve vietnamské populaci jsme v této diplomové práci použili DNA získanou ze stěrů bukální sliznice. Předností této metody je zejména neinvazivnost, ale také poměrně snadná manipulace, což se potvrdilo relativně krátkým časem, za který jsme vzorky odebrali. Na druhou stranu se nám při analýze DNA z bukální sliznice opakovaně stalo, že úspěšnost jednotlivých kroků byla většinou nižší než při analýze DNA z plné krve. Další nevýhodou této metody odběru materiálu je riziko kontaminace mikrobiomem přítomným v ústní dutině. Genom mikroorganismů se však od toho lidského natolik liší, že riziko vlivu případné kontaminace na konečných výsledcích lze považovat za nulové.

Genotypizace byla provedena dvěma způsoby, PCR-RFLP a real-time PCR. Real-time metoda poskytla výrazně vyšší úspěšnost (100%) než metoda štěpení restričních fragmentů. Při této metodě se také ušetřil čas potřebný k inkubaci ve fázi štěpení endonukleázou. Metoda PCR-RFLP naopak poskytla prostor pro uvědomění si významu použitých primerů i restriktáz.

Při porovnání frekvence genotypů mezi českou a vietnamskou populací jsme našli významné rozdíly ve 4 z 8 genů, a to v genech: FTO, TCF7L2, ADH1B a LCT.

Velmi malé či nepatrné rozdíly byly shledány v polymorfismech genů MC4R, HFE (varianty H63D a C282Y) a ApoE.

6.1. Laktózová intolerance

Ze všech genů byl rozdíl nejvíce patrný v genu pro laktázovou intoleranci, kde jsme dle očekávání našli, že frekvence výskytu homozygotů pro alelu C, kteří nebudou s největší pravděpodobností schopni trávit laktózu, je ve vietnamské populaci prakticky stoprocentní. Zatímco frekvence alely T zodpovědné za laktázovou perzistenci v bělošské populaci se mezi českými obyvateli vyskytuje v drtivé většině.

Kvůli homogenitě v zastoupení alel ve vietnamské populaci jsme metodiku pro genotypizaci varianty rs4988235 ještě ověřili tak, že jsme souběžně analyzovali vzorky z vietnamské populace i vzorky z české populace (vzorky dostupné z projektu post-MONICA). Po provedení RFLP jsme potvrdili správnost metodiky, kdy se homozygotní a heterozygotní formy v české populaci objevily v očekávané frekvenci.

S tímto nálezem korelují data z dotazníkového šetření, ve kterém jsme se respondentů ptali na jejich frekvenci konzumace mléčných výrobků. Třebaže většina vietnamských respondentů ve svém dotazníku ve výčtu svých potravinových alergií a intolerancí laktázovou intoleranci neuvedli, z výsledků jasně vyplývá, že respondenti vietnamského původu konzumují výrazně méně mléka než lidé českého etnika.

Podle Jarvise a kol. (2002) většina výživových doporučení v západních zemích doporučuje pro své obyvatelstvo 3 sklenice mléka denně pro dostatečný příjem vápníku i

jiných živin v mléce obsažených. Toto doporučení by se však v zemích Východní Asie, a tedy i ve Vietnamu, nejspíše nemohlo uplatňovat, neboť velká část zdejších obyvatel trpí laktózovou intolerancí. U takových populací je nutné k hrazení chybějícího vápníku a bílkovin nacházejících se v mléce nahradit jiným způsobem, a tudíž by pro ně měla být výživová doporučení vhodně modifikována. Náhradu by mohlo představit výrobky s nižším obsahem laktózy jako jsou různé druhy sýrů, bezlaktózové mléko/mléčné výrobky, výrobky fortifikované vápníkem atd.

6.2. Vliv genových polymorfismů na konzumaci alkoholu

Dalším genem, pro který jsme shledali rozdíl ve frekvenci výskytu jeho genotypů významný, je ADH1B kódující alkohol dehydrogenázu. Jak již bylo řečeno, alela A varianty rs1229984 kódující histidin v pozici 48 podjednotky $\beta 2$ je ve významně vyšším zastoupení ve vietnamské populaci než v populaci české. Podjednotka $\beta 2$ podmíněná alelou A spolu s podjednotkou $\beta 3$ (frekventovaná zejména v africké populaci) mohou za příznaky kocoviny zahrnující červenání v obličeji, nauzeu a zvracení. Předpokládá se také, že horší průběh kocoviny je jednou z příčin, proč nositelé alely A mají nižší tendenci k alkoholismu. Ve výsledcích dotazníkového šetření se nám tato domněnka do jisté míry potvrdila. V dotazníku jsme se respondentů ptali na jejich frekvenci konzumace alkoholických nápojů (piva, vína a destilátů) a na objem vypitého alkoholického nápoje v jedné dávce. Z uvedených dat jsme vypočítali průměrnou roční spotřebu alkoholu pro každou populaci. Významně vyšší spotřeba zejména piva v české populaci je zřejmě dána i nižším zastoupením rychlých metabolizátorů pro alkohol dehydrogenázu v populaci.

Výskyt alely A, a tedy i přítomnost podjednotky $\beta 2$, však nemusí nutně vést k nižší konzumaci alkoholu, jak dokazuje práce Hendershota a kol. (2009), kde autoři našli méně signifikantní korelaci mezi rizikovým genotypem pro ADH1B než pro gen kódující aldehyddehydrogenázu (ALDH2) zejména u mužů korejského původu. ALDH2 je druhým důležitým genem v metabolismu alkoholu. Varianta Glu487Lys (rs671) tohoto genu, která se vyskytuje ve vyšší frekvenci v populaci obyvatel Východní Asie (varianta je monofornní v bělošských populacích), může též představovat ochranu svého nositele před závislostí na alkoholu. Nositelé této varianty dostanou po konzumaci alkoholu rudý ruměnc v obličeji, označovaný jako „flushing face“. Tento fenomén spolu s nauzeou a tachykardií po požití alkoholu se nachází u zhruba 36 % východních Asiatů. Tyto osoby jsou však na druhou stranu při nadměrné konzumaci alkoholu citlivější k nemocem indukovaným alkoholem jako jsou různé nádory jater a jícnu i dalších částí gastrointestinálního traktu. Pro takové jedince s variantou rs671 by mělo být vysloveno zvýšené zdravotní riziko a doporučení omezovat konzumaci alkoholických nápojů. (Hurley et al, 2002)

Podobně jako u ADHB existuje několik forem ALDH enzymů: Alela ALDH2*2 (rs671 A) kóduje enzym, který vykazuje sníženou aktivitu oproti ALDH2*1. V alele ALDH2*2 dochází k substituci aminokyseliny lyzin za glutamát v pozici 504, která zapříčiňuje téměř nulovou funkci enzymu ALDH2 a nemožnost oxidace acetaldehydu na

acetát. Z tohoto důvodu se acetaldehyd v tomto případě rovněž nadměrně kumuluje. (Ding et al, 2010; Lin a Cheng, 2002)

Přesný důvod k takové pozitivní selekci ještě není znám. Goldman a Enoch (2001) však přišli se dvěma hypotézami. V té první z nich mohou podle autorů za takovou frekvenci alel v Asii mykotoxiny v plesnivě rýži, jež jsou rizikovým faktorem pro řadu nádorových onemocnění. Podle této hypotézy mohou enzymy ALDH převést promykotoxiny na toxiny, tudíž nositelé mutace genu ALDH budou produkovat méně toxinů a mít tak výhodu oproti homozygotům s majoritní alelou pro ALDH. Ve druhé hypotéze se diskutuje o významu acetaldehydu v boji proti řadě bakterií a protozoí k němu citlivých. Nositelé alely ALDH2*2 tedy budou mít vyšší koncentraci plazmatického acetaldehydu a pravděpodobně budou i více rezistentní k patogenům a infekcím, tudíž by mohli mít i vyšší šanci na přežití.

6.3. Diabetes mellitus 2. typu

Významný rozdíl ve frekvenci výskytu alel byl zaznamenán také u polymorfismu rs7903146 v genu TCF7L2. Polymorfismy genu TCF7L2 jsou podle mnoha studií významně asociovány s rizikem vzniku DM2T, přičemž nejvyšší riziko vykazuje varianta rs7903146, kterou jsme analyzovali i v této práci. Výrazně nižší distribuce rizikového genotypu TT ve vietnamské populaci je zřejmě také důvodem pro nižší prevalenci DM2T v této zemi (7,1 % - Ministerstvo zdravotnictví VN, 2022) oproti ČR (10 % - ÚZIS, 2017). Byť tomu neodpovídají data z dotazníkového šetření, kde je výskyt DM2T vyšší ve vietnamské populaci než v české populaci. Za takové výsledky mohla zřejmě i nesrovnatelnost mezi věkovými skupinami v obou populacích, kdy bylo do studie zahrnuto více jedinců vietnamského původu, kteří jsou vyššího věku. Můžeme zde však také klást otázku, zda a do jaké míry může za zvýšený výskyt metabolických onemocnění ve skupině Vietnamců dlouhodobě žijících v ČR změna stravovacích zvyklostí a adaptace na nové životní prostředí.

6.4. Obezita

Na vzniku DM2T i jiných metabolických onemocnění se může rovněž podílet i obezita. V asijské populaci je však nižší korelace mezi BMI a rizikem pro DM2T než pro evropskou populaci. Dle Boffety a kol. (2004) a Koh-Banerjeeho a kol. (2011) představuje obezita 3x vyšší riziko rozvoje DM2T u Asiatů, ale toto riziko je až 8x vyšší pro obyvatele bělošského etnika.

Pro vznik obezity jsou považovány polymorfismy v genu FTO. Jde například o polymorfismus rs993960, který vykazuje nejvýznamnější asociaci s vyšším BMI a obezitou. Jiné polymorfismy, včetně toho, který byl předmětem i této práce – rs17817449, a polymorfismu 1421085 jsou však se zmíněným polymorfismem rs993960 v téměř úplné genové vazbě. Analyzovali jsme proto variantu rs17817449, jejíž genotypizace mívá vyšší úspěšnost (Hubáček et al., 2009). Nositelé rizikové alely A varianty rs9939609 mají změněný příjem potravy: homozygoti AA přijímají o 1231 kJ více a heterozygoti AT přijímají o 505 kJ více než homozygoti TT. Což vysvětluje množství studií na význam alel

genu FTO po dietních intervencích, které našly, že nositelé alely A také lépe reagují na snížení energetického příjmu (Speakman, 2010; de Luis, 2013). Homozygot nesoucí rizikovou alelu může mít až o 3 kg vyšší váhu než homozygot bez ní a jedna riziková alela může představovat až o 1 kg navíc oproti nerizikové alele (Gerken et al., 2007; Andersen et al., 2008). Metaanalýza z roku 2013 se 177 330 subjekty (154 439 bílých, 5 776 Afro-Američanů, 17 115 Asiatů) ze 40 studií našla, že minoritní alela (A) varianty rs9939609 genu FTO je asociována s vyšším BMI u všech o průměrně 0,30 kg/m² po 1 rizikové alele, u bílých > 0,34 kg/m² na jednu alelu, u Asiatů > 0,25 kg/m², ale nenašla se žádná asociace u Afroameričanů (efekt jedné alely je mezi -0,20 – 0,20 kg/m²). Tato alela je spojována s nižším celkovým energetickým příjmem (-6,4 kcal/den na jednu alelu), vyšším příjmem proteinů (+0,08 % CEP na jednu alelu) ale nižším příjmem sacharidů (efekt jedné alely: -0,07 % CEP), kdežto asociace mezi minoritní alelou varianty genu FTO a příjmem tuků nebyla potvrzena. (Qi et al., 2013)

Obezita se ve vietnamské populaci vyskytuje výrazně méně než v české populaci, což dokazují i výsledky z dotazníků. Tento náleží je tedy znovu v souladu s nižší (o zhruba 2,5x) frekvencí výskytu alely G mezi Vietnamci než mezi Čechy.

Přímou korelaci s příjmem potravy, a tedy nepřímou korelaci s BMI a obezitou, vykazuje také gen MC4R. Tady jsme však hodnoty ve frekvenci jak jednotlivých alel, tak v rozložení genotypů shledali téměř totožné pro obě populace a není tedy pravděpodobné, že tento gen bude hrát roli v pozorovaných rozdílech ve výskytu obezity mezi populacemi.

6.5. ApoE a cholesterolémie

Gen ApoE kódující apolipoprotein E jako jeden z klíčových genů v metabolismu lipidů, a tedy i predisponující rizikový faktor KVO i Alzheimerovy choroby, je hojně genotypizován po celém světě. Je známo, že nositelé alel pro APOE*2 mají v porovnání s nositeli alel pro APOE*3 nižší hladinu LDL cholesterolu. Alely pro APOE*4, které naopak vedou k vyšší hladině LDL cholesterolu, jsou rizikovými faktory pro ischemické choroby a KVO. V této práci jsme zaznamenali jen mírně zvýšenou frekvenci rizikové izoformy E4 ve vietnamské populaci. Tato frekvence však odpovídá frekvenci v jiných východoasijských populacích jako je Korea, Japonsko, Malajsie (10–12 %), o něco nižší je frekvence alel pro e4 v čínské populaci (7,1 %). Borco a kol. (1999) ve své práci porovnali frekvence výskytu alel pro ApoE v různých populacích a diskutovali, zda patří ApoE mezi tzv. „šetřící geny“. Domnívali se, že izoforma e3 poskytovala významnou výhodu při změně způsobu života ze sběračství na chov a pěstování. Tato izoforma se proto vyskytuje nejčastěji v těch oblastech, kde je již dlouho zavedeno zemědělství. Podle stejných autorů může být výskyt izoformy e4 stále užitečný, a to zejména v těch populacích, kde bývá zásobování potravy jen nárazové či nedostatečné. Tato jinak riziková izoforma zde představuje jistou prevenci před příliš nízkými hladinami cholesterolu.

6.6. Hereditární hemochromatóza

Hereditární hemochromatózu, pokud je včas diagnostikována, lze poměrně dobře léčit. Mutace v genu HFE představují jednu z nejčastějších příčin hereditární hemochromatózy. Rozpoznat přítomnost rizikových alel v genu HFE se proto může představit jako významné jak v prevenci, tak i v terapii hereditární hemochromatózy. Ze tří variant v genu HFE: C282Y, H63D a S65C má největší význam varianta C282Y (rs1800562), kdy výskyt rizikové alely A v homozygotní kombinaci představuje riziko vážné hemochromatózy, především u mužů a postmenopauzálních žen. U dvou variant, které jsme genotypizovali v této práci, byl výskyt rizikových alel vždy poměrně nízký v obou populacích, a to zejména ve vietnamské populaci. Podle Simona a kol. (1980) se mutace v genu HFE poprvé objevily u Keltů na území dnešního Irska a Walesu a postupně se rozšířily primárně na zbylé oblasti Evropy a pak, i když v nesrovnatelně menší míře, i do zbytku světa. Výskyt mutací je tak v asijských zemích obecně velmi nízký.

6.7. Limitace

Jsem si plně vědoma limitací, které moje práce obsahuje. Relativně malý výzkumný vzorek představující vietnamskou populaci by mohl být příčinou problémových výpočtů při porovnávání. Do této práce byly také více zahrnuty ženy vietnamského původu nežli muži, což ve výsledku mohlo do jisté míry ovlivnit například hodnoty v konzumaci alkoholických nápojů. Rozdíly mezi populacemi ve frekvencích některých genotypů byly však tak velké, že bylo možné je považovat za signifikantní i přes uvedené nedostatky. Z důvodu nemožnosti získání údajů ohledně frekvence konzumace potravy od českých jedinců zapojených do projektu post-MONICA jsem pro účel této práce použila data z mé bakalářské práce. Věkové rozložení jedinců dvou skupin proto nebylo zcela srovnatelné, což mohlo mít vliv na hodnoty frekvence výskytu metabolických chorob, které ne zcela odpovídají oficiálním datům vydaným statistickými úřady dvou zemí.

7. Závěr

V rámci této diplomové práce byly porovnány frekvence výskytu alel polymorfismů v různých genech, které jsou dlouho známy svou asociací s některou z metabolických civilizačních chorob nebo jinak ovlivňují metabolismus různých živin. Jmenovitě šlo o polymorfismy v genech FTO a MC4R v souvislosti s nadváhou a obezitou, v genu TCF7L2 v souvislosti s rizikem vzniku DM2T, v genu HFE (C282Y a H63D) v metabolismu železa, v genu ADH1B v metabolismu alkoholu a v neposlední řadě polymorfismus ovlivňují laktázovou perzistenci a nepřímo tak příjem mléka a vápníku.

Potvrdily se nám hypotézy o rozdílném zastoupení alel v české a vietnamské populaci, a to zejména u polymorfismů v genu pro laktázovou intoleranci, v genu pro alkohol-dehydrogenázu, v genu TCF7L2 a v genu FTO. Ve třech posledně zmíněných variantách jsme vždy našli nižší frekvenci výskytu rizikové alely ve vietnamské komunitě než v majoritní populaci české. V genu pro laktázovou intoleranci jsme naopak našli, že výskyt alely zodpovědné za laktázovou intoleranci byl vyšší u Vietnamců, což koreluje s nalezenými údaji o nižší konzumaci mléka v této populaci.

Výsledky práce byly také podloženy počtem studií zahrnujících bělošskou populaci a/nebo asijskou populaci. Pro účel této práce jsme rovněž vyhledávali publikované práce, které se zaměřily na genotypizaci a porovnání výskyt alel zmíněných polymorfismů mezi českou a vietnamskou populací. Z výsledků dostupných v databázi vědeckých článků Pubmed se domníváme, že tato práce je svým tématem a zaměřením jedinečná. Také se domníváme, že výsledky genotypizace variant rs4988235 pro laktázovou perzistenci, rs7903146 v genu TCF7L2 a rs17782313 v genu MC4R v dospělé vietnamské populaci zatím ještě neexistují, nebo ještě nejsou publikovány a výsledky v této práci by mohly být v dané problematice první.

Přínos této práce vidím zejména ve významu znalosti genetických predispozic k metabolickým onemocněním, které by se měly odrážet i v obecných výživových a intervenčních doporučeních pro různé skupiny obyvatel. Tato práce by tak mohla poskytnout jistý podklad pro vytvoření specifického výživového doporučení určeného hlavně pro místní komunitu Vietnamců, kteří se v České republice stále adaptují na nové životní prostředí.

8. Seznam použité literatury

- Abondio, P., Sazzini, M., Garagnani, P., Boattini, A., Monti, D., Franceschi, C., Luiselli, D., Giuliani, C., (2019). The Genetic Variability of APOE in Different Human Populations and Its Implications for Longevity. *Genes*, 10(3), 222. <http://doi.org/10.3390/genes10030222> (obrázek 5 na straně 24)
- Barbujani, G., Magagni, A., Minch, E., & Cavalli-Sforza, L. L. (1997). An apportionment of human DNA diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), 4516–4519. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4516>
- Beckers, S., Zegers, D., Van Gaal, L. F., & Van Hul, W. (2009). The role of the leptin-melanocortin signalling pathway in the control of food intake. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 19(4), 267–287. <https://doi.org/10.1615/critreueukargeneexpr.v19.i4.20>
- Bennett, A. M., Di Angelantonio, E., Ye, Z., Wensley, F., Dahlin, A., Ahlbom, A., Keavney, B., Collins, R., Wiman, B., de Faire, U., & Danesh, J. (2007). Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*, 298(11), 1300–1311. <https://doi.org/10.1001/jama.298.11.1300>
- Bennett, C. N., Ross, S. E., Longo, K. A., Bajnok, L., Hemati, N., Johnson, K. W., Harrison, S. D., & MacDougald, O. A. (2002). Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30998–31004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204527200>
- Benyamin, B., Ferreira, M. A., Willemsen, G., Gordon, S., Middelberg, R. P., McEvoy, B. P., Hottenga, J. J., Henders, A. K., Campbell, M. J., Wallace, L., Frazer, I. H., Heath, A. C., de Geus, E. J., Nyholt, D. R., Visscher, P. M., Penninx, B. W., Boomsma, D. I., Martin, N. G., Montgomery, G. W., & Whitfield, J. B. (2009). Common variants in TM6RS6 are associated with iron status and erythrocyte volume. *Nature Genetics*, 41(11), 1173–1175. <https://doi.org/10.1038/ng.456>
- Bellia, A., Giardina, E., Lauro, D., Tesauro, M., Di Fede, G., Cusumano, G., Federici, M., Rini, G. B., Novelli, G., Lauro, R., & Sbraccia, P. (2009). "The Linosa Study": epidemiological and heritability data of the metabolic syndrome in a Caucasian genetic isolate. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, 19(7), 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2008.11.002>
- Beutler, E., Felitti, V. J., Koziol, J. A., Ho, N. J., & Gelbart, T. (2002). Penetrance of 845G--> A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet (London, England)*, 359(9302), 211–218. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07447-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07447-0)
- Bloudíčková, S., Kuthanová, L., Hubáček, J. A., & MIA group (2014). MTHFR and HFE, but not preproghrelin and LBP, polymorphisms as risk factors for all-cause end-stage renal disease development. *Folia Biologica*, 60(2), 83–88.
- Boffetta, P., McLerran, D., Chen, Y., Inoue, M., Sinha, R., He, J., Gupta, P. C., Tsugane, S., Irie, F., Tamakoshi, A., Gao, Y. T., Shu, X. O., Wang, R., Tsuji, I., Kuriyama, S., Matsuo, K., Satoh, H., Chen, C. J., Yuan, J. M., Yoo, K. Y., ... Potter, J. D. (2011). Body mass index and diabetes in Asia: a cross-sectional pooled analysis of 900,000 individuals in the Asia cohort consortium. *PloS One*, 6(6), e19930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019930>
- Bouchard, C., & Ordovas, J. (Eds.). (2014). *Recent Advances in Nutrigenetics and Nutrigenomics*. Academic Press.
- Brennan, P., McKay, J., Moore, L., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Rudnai, P., Fabianova, E., Mates, D., Bencko, V., Foretova, L., Janout, V., Chow, W. H., Rothman, N., Chabrier, A., Gaborieau, V., Timpson, N., Hung, R. J., & Smith, G. D. (2009). Obesity and cancer: Mendelian randomization approach utilizing the FTO genotype. *International Journal of Epidemiology*, 38(4), 971–975. <https://doi.org/10.1093/ije/dyp162>

- Caterina, R., Martinez, J., & Kohlmeier, M. (2019). Principles of nutrigenetics and nutrigenomics: Fundamentals of individualized nutrition (R. De Caterina, A. J. Martinez, & M. Kohlmeier, Eds.). San Diego, CA: Academic Press.
- Cauchi, S., El Achhab, Y., Choquet, H., Dina, C., Krempler, F., Weitgasser, R., Nejjari, C., Patsch, W., Chikri, M., Meyre, D., & Froguel, P. (2007). TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *85*(7), 777–782. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0203-4>.
- Cavalli-Sforza, L. L., & Feldman, M. W. (2003). The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. *Nature Genetics*, *33 Suppl*, 266–275. <https://doi.org/10.1038/ng1113>.
- Cha, S. W., Choi, S. M., Kim, K. S., Park, B. L., Kim, J. R., Kim, J. Y., & Shin, H. D. (2008). Replication of genetic effects of FTO polymorphisms on BMI in a Korean population. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *16*(9), 2187–2189. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.314>
- Chi-Square Test Calculator. (25.3.2023). Retrieved from <https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/default2.aspx>.
- Cífková, R., Bruthans, J., Wohlfahrt, P., Krajčoviechová, A., Šulc, P., Jozífová, M., Eremiášová, L., Pudil, J., Linhart, A., Widimský, J., Jr, Filipovský, J., Mayer, O., Jr, Škodová, Z., Poledne, R., Stávek, P., & Lánská, V. (2020). 30-year trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population, Czech MONICA and Czech post-MONICA, 1985 - 2016/17. *PloS One*, *15*(5), e0232845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232845>
- Cone R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, *8*(5), 571–578. <https://doi.org/10.1038/nn1455>.
- Coop, G., Pickrell, J. K., Novembre, J., Kudaravalli, S., Li, J., Absher, D., Myers, R. M., Cavalli-Sforza, L. L., Feldman, M. W., & Pritchard, J. K. (2009). The role of geography in human adaptation. *PLoS Genetics*, *5*(6), e1000500. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000500>.
- Corbo, R. M., & Scacchi, R. (1999). Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele?. *Annals of Human Genetics*, *63*(Pt 4), 301–310. <https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.1999.6340301.x>
- Dai, H. J., Wu, J. C., Tsai, R. T., Pan, W. H., & Hsu, W. L. (2013). T-HOD: a literature-based candidate gene database for hypertension, obesity and diabetes. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, *2013*, bas061. <https://doi.org/10.1093/database/bas061>.
- de Campos, W. N., Massaro, J. D., Cançado, E. L. R., Wiesel, C. E. V., Simões, A. L., Teixeira, A. C., de Souza, F. F., Mendes-Junior, C. T., Martinelli, A. L. C., & Donadi, E. A. (2019). Comprehensive analysis of HFE gene in hereditary hemochromatosis and in diseases associated with acquired iron overload. *World journal of hepatology*, *11*(2), 186–198. <https://doi.org/10.4254/wjh.v11.i2.186> (obrázek 9 na straně 31)
- De Caterina, R., 2007. Endothelial Dysfunctions in Vascular Disease. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Desbois-Mouthon, C., Cadoret, A., Blivet-Van Eggelpoël, M. J., Bertrand, F., Cherqui, G., Perret, C., & Capeau, J. (2001). Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation. *Oncogene*, *20*(2), 252–259. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204064>.
- Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Körner, A., Jacobson, P., Carlsson, L. M., Kiess, W., Vatin, V., Lecoœur, C., Delplanque, J., Vaillant, E., Pattou, F., Ruiz, J., Weill, J., Levy-Marchal, C., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., Le Stunff, C., ... Froguel, P. (2007). Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature Genetics*, *39*(6), 724–726. <https://doi.org/10.1038/ng2048>

- Ding, J. H., Li, S. P., Cao, H. X., Wu, J. Z., Gao, C. M., Liu, Y. T., Zhou, J. N., Chang, J., & Yao, G. H. (2010). Alcohol dehydrogenase-2 and aldehyde dehydrogenase-2 genotypes, alcohol drinking and the risk for esophageal cancer in a Chinese population. *Journal of Human Genetics*, 55(2), 97–102. <https://doi.org/10.1038/jhg.2009.129>.
- Duval, A., Busson-Leconiat, M., Berger, R., & Hamelin, R. (2000). Assignment of the TCF-4 gene (TCF7L2) to human chromosome band 10q25.3. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 88(3-4), 264–265. <https://doi.org/10.1159/000015534>.
- Dwyer, J. H., Allayee, H., Dwyer, K. M., Fan, J., Wu, H., Mar, R., Lusk, A. J., & Mehrabian, M. (2004). Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 350(1), 29–37. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa025079>.
- Enattah, N. S., Jensen, T. G., Nielsen, M., Lewinski, R., Kuokkanen, M., Rasinpera, H., El-Shanti, H., Seo, J. K., Alifrangis, M., Khalil, I. F., Natah, A., Ali, A., Natah, S., Comas, D., Mehdi, S. Q., Groop, L., Vestergaard, E. M., Imtiaz, F., Rashed, M. S., Meyer, B., ... Peltonen, L. (2008). Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations reflects different history of adaptation to milk culture. *American Journal of Human Genetics*, 82(1), 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.012>.
- Enoch MA, Goldman D. (2001) The genetics of alcoholism and alcohol abuse. *Current Psychiatry Reports*, 3(2):144-51. doi: 10.1007/s11920-001-0012-3. PMID: 11276410
- Fang, L., Ahn, J. K., Wodziak, D., & Sibley, E. (2012). The human lactase persistence-associated SNP -13910*T enables in vivo functional persistence of lactase promoter-reporter transgene expression. *Human Genetics*, 131(7), 1153–1159. <https://doi.org/10.1007/s00439-012-1140-z>.
- Fani, L., Bak, S., Delhanty, P. et al (2014). The melanocortin-4 receptor as target for obesity treatment: a systematic review of emerging pharmacological therapeutic options. *International Journal of Obesity*, 38, 163–169. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.80> (obrázek 4 na straně 22)
- Farhud, D., Zarif Yeganeh, M., & Zarif Yeganeh, M. (2010). Nutrigenomics and nutrigenetics. *Iranian journal of public health*, 39(4), 1–14. (obrázek 1 na straně 14)
- Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, Prass CE, Starnes SM, Wolff RK, Parkkila S, Sly WS, Schatzman RC (1997). The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *Journal of Biology and Chemistry*, 272(22):14025-8. doi: 10.1074/jbc.272.22.14025. PMID: 9162021.
- Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Jr, Ellis, M. C., Fullan, A., Hinton, L. M., Jones, N. L., Kimmel, B. E., Kronmal, G. S., Lauer, P., Lee, V. K., Loeb, D. B., Mapa, F. A., McClelland, E., Meyer, N. C., ... Wolff, R. K. (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics*, 13(4), 399–408. <https://doi.org/10.1038/ng0896-399>
- Florez, J. C., Hirschhorn, J., & Altshuler, D. (2003). The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 4, 257–291. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.4.070802.110436>
- Florez, J. C., Jablonski, K. A., Bayley, N., Pollin, T. I., de Bakker, P. I., Shuldiner, A. R., Knowler, W. C., Nathan, D. M., Altshuler, D., & Diabetes Prevention Program Research Group (2006). TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *The New England Journal of Medicine*, 355(3), 241–250. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa062418>.

- Folgueras, A. R., de Lara, F. M., Pendás, A. M., Garabaya, C., Rodríguez, F., Astudillo, A., Bernal, T., Cabanillas, R., López-Otín, C., & Velasco, G. (2008). Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood*, *112*(6), 2539–2545. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-149773>.
- Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R., Elliott, K. S., Lango, H., Rayner, N. W., Shields, B., Harries, L. W., Barrett, J. C., Ellard, S., Groves, C. J., Knight, B., Patch, A. M., Ness, A. R., Ebrahim, S., Lawlor, D. A., ... McCarthy, M. I. (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science (New York, N.Y.)*, *316*(5826), 889–894. <https://doi.org/10.1126/science.1141634>.
- Ganef, I. M. M., Bos, M. M., van Heemst, D., & Noordam, R. (2019). BMI-associated gene variants in FTO and cardiometabolic and brain disease: obesity or pleiotropy?. *Physiological Genomics*, *51*(8), 311–322. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00040.2019>
- Gantz, I., Miwa, H., Konda, Y., Shimoto, Y., Tashiro, T., Watson, S. J., DelValle, J., & Yamada, T. (1993). Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(20), 15174–15179.
- Geoghegan, G., Simcox, J., Seldin, M. M., Parnell, T. J., Stubben, C., Just, S., Begaye, L., Lusic, A. J., & Villanueva, C. J. (2019). Targeted deletion of Tcf7l2 in adipocytes promotes adipocyte hypertrophy and impaired glucose metabolism. *Molecular Metabolism*, *24*, 44–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.03.003>.
- Gerken, T., Girard, C. A., Tung, Y. C., Webby, C. J., Saudek, V., Hewitson, K. S., Yeo, G. S., McDonough, M. A., Cunliffe, S., McNeill, L. A., Galvanovskis, J., Rorsman, P., Robins, P., Prieur, X., Coll, A. P., Ma, M., Jovanovic, Z., Farooqi, I. S., Sedgwick, B., Barroso, I., ... Schofield, C. J. (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5855), 1469–1472. <https://doi.org/10.1126/science.1151710>
- Gloyn A. L. (2003). The search for type 2 diabetes genes. *Ageing Research Reviews*, *2*(2), 111–127. [https://doi.org/10.1016/s1568-1637\(02\)00061-2](https://doi.org/10.1016/s1568-1637(02)00061-2)
- Grant, S. F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadottir, A., Styrkarsdottir, U., Magnusson, K. P., Walters, G. B., Palsdottir, E., Jonsdottir, T., Gudmundsdottir, T., Gylfason, A., Saemundsdottir, J., Wilensky, R. L., Reilly, M. P., ... Stefansson, K. (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics*, *38*(3), 320–323. <https://doi.org/10.1038/ng1732>
- Griffiths, University Anthony J F, Wessler, University Susan R, Carroll, D. S. B., & Doebley, J. (2015). Introduction to genetic analysis (11th ed.). W.H. Freeman.
- Han, Y., Gu, S., Oota, H., Osier, M. V., Pakstis, A. J., Speed, W. C., Kidd, J. R., & Kidd, K. K. (2007). Evidence of positive selection on a class I ADH locus. *American Journal of Human Genetics*, *80*(3), 441–456. <https://doi.org/10.1086/512485>.
- Hancock, A. M., Witonsky, D. B., Gordon, A. S., Eshel, G., Pritchard, J. K., Coop, G., & Di Rienzo, A. (2008). Adaptations to climate in candidate genes for common metabolic disorders. *PLoS genetics*, *4*(2), e32. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040032>.
- Hara, M., Iso-O, N., Satoh, H., Noto, H., Togo, M., Ishibashi, S., Kimura, S., Kadowaki, T., Hashimoto, Y., & Tsukamoto, K. (2006). Differential effects of apolipoprotein E isoforms on lipolysis of very low-density lipoprotein triglycerides. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *55*(8), 1129–1134. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2006.04.009>
- Haupt, A., Thamer, C., Heni, M., Ketterer, C., Machann, J., Schick, F., Machicao, F., Stefan, N., Claussen, C. D., Häring, H. U., Fritsche, A., & Staiger, H. (2010). Gene variants of TCF7L2

- influence weight loss and body composition during lifestyle intervention in a population at risk for type 2 diabetes. *Diabetes*, 59(3), 747–750. <https://doi.org/10.2337/db09-1050>.
- Haupt, A., Thamer, C., Staiger, H., Tschritter, O., Kirchhoff, K., Machicao, F., Häring, H. U., Stefan, N., & Fritsche, A. (2009). Variation in the FTO gene influences food intake but not energy expenditure. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 117(4), 194–197. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1087176>.
- Hendershot, C. S., Collins, S. E., George, W. H., Wall, T. L., McCarthy, D. M., Liang, T., & Larimer, M. E. (2009). Associations of ALDH2 and ADH1B genotypes with alcohol-related phenotypes in Asian young adults. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 33(5), 839–847. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.00903.x>
- Henneman, P., Aulchenko, Y. S., Frants, R. R., van Dijk, K. W., Oostra, B. A., & van Duijn, C. M. (2008). Prevalence and heritability of the metabolic syndrome and its individual components in a Dutch isolate: the Erasmus Rucphen Family study. *Journal of Medical Genetics*, 45(9), 572–577. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.058388>.
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., & Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, 142(1), 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.028>.
- Higgins, P. B., Fernández, J. R., Goran, M. I., & Gower, B. A. (2005). Early ethnic difference in insulin-like growth factor-1 is associated with African genetic admixture. *Pediatric Research*, 58(5), 850–854. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000182583.92130.08>.
- Hindorff, L. A., Sethupathy, P., Junkins, H. A., Ramos, E. M., Mehta, J. P., Collins, F. S., & Manolio, T. A. (2009). Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), 9362–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903103106>.
- Hu F. B. (2011). Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes care*, 34(6), 1249–1257. <https://doi.org/10.2337/dc11-0442>.
- Hubáček, J. A., Adámková, V., Šedová, L., Olišarová, V., Adámek, V., & Tóthová, V. (2017). Frequency of adult type-associated lactase persistence LCT-13910C/T genotypes in the Czech/Slav and Czech Roma/Gypsy populations. *Genetics and Molecular Biology*, 40(2), 450–452. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0071>.
- Hubacek, J. A., Philipp, T., Adamkova, V., Majek, O., & Dusek, L. (2023). A haemochromatosis-causing HFE mutation is associated with SARS-CoV-2 susceptibility in the Czech population. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 538, 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.12.025>.
- Hubacek, J. A., Pitha, J., Adamkova, V., Lanska, V., & Poledne, R. (2009). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index in males and postmenopausal females but not in premenopausal females. Czech post-MONICA and 3PMFs studies. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47(4), 387–390. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.109>
- Hubacek, J. A., Vrablik, M., Dlouha, D., Stanek, V., Gebauerova, M., Adamkova, V., Ceska, R., Dostálová, G., Linhart, A., Vitek, L., & Pitha, J. (2016). Gene variants at FTO, 9p21, and 2q36.3 are age-independently associated with myocardial infarction in Czech men. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 454, 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.01.005>
- Hurley TD, Edenberg HJ, Li T-K. Pharmacogenomics: The Search for Individualized Therapies. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2002. The pharmacogenomics of alcoholism; pp. 417–441.
- Chakravarty, M. V., & Booth, F. W. (2004). Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *Journal of*

- Applied Physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 96(1), 3–10.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00757.2003>.
- Chan, J. C., Malik, V., Jia, W., Kadowaki, T., Yajnik, C. S., Yoon, K. H., & Hu, F. B. (2009). Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *JAMA*, 301(20), 2129–2140.
<https://doi.org/10.1001/jama.2009.726>
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S., & Gyllensten, U. (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, 408(6813), 708–713.
<https://doi.org/10.1038/35047064>
- International HapMap 3 Consortium, Altshuler, D. M., Gibbs, R. A., Peltonen, L., Altshuler, D. M., Gibbs, R. A., Peltonen, L., Dermitzakis, E., Schaffner, S. F., Yu, F., Peltonen, L., Dermitzakis, E., Bonnen, P. E., Altshuler, D. M., Gibbs, R. A., de Bakker, P. I., Deloukas, P., Gabriel, S. B., Gwilliam, R., Hunt, S., ... McEwen, J. E. (2010). Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*, 467(7311), 52–58.
<https://doi.org/10.1038/nature09298>.
- Itan, Y., Jones, B. L., Ingram, C. J., Swallow, D. M., & Thomas, M. G. (2010). A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-36>.
- Jarvis, J. K., & Miller, G. D. (2002). Overcoming the barrier of lactose intolerance to reduce health disparities. *Journal of the National Medical Association*, 94(2), 55–66..
- Jin, T., George Fantus, I., & Sun, J. (2008). Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cellular Signalling*, 20(10), 1697–1704.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.04.014>.
- Katsuura-Kamano, S., Uemura, H., Arisawa, K., Yamaguchi, M., Hamajima, N., Wakai, K., Okada, R., Suzuki, S., Taguchi, N., Kita, Y., Ohnaka, K., Kairupan, T. S., Matsui, D., Oze, I., Mikami, H., Kubo, M., & Tanaka, H. (2014). A polymorphism near MC4R gene (rs17782313) is associated with serum triglyceride levels in the general Japanese population: the J-MICC Study. *Endocrine*, 47(1), 81–89. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0306-y>.
- Koh-Banerjee, P., Wang, Y., Hu, F. B., Spiegelman, D., Willett, W. C., & Rimm, E. B. (2004). Changes in body weight and body fat distribution as risk factors for clinical diabetes in US men. *American Journal of Epidemiology*, 159(12), 1150–1159.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwh167>
- Kohlmeier, M. (2015). *Nutrient metabolism: Structures, functions, and genes* (2nd ed.). San Diego, CA: Academic Press.
- Kochetova, O. V., Korytina, G. F., Akhmadishina, L. Z., Semenov, E. E., & Viktorova, T. V. (2015). *Genetika*, 51(2), 248–255..
- Kretchmer N. (1971). Lactose and lactase--a historical perspective. *Gastroenterology*, 61(6), 805–813.
- Lai, C. Q., Tucker, K. L., Choudhry, S., Parnell, L. D., Mattei, J., García-Bailo, B., Beckman, K., Burchard, E. G., & Ordovás, J. M. (2009). Population admixture associated with disease prevalence in the Boston Puerto Rican health study. *Human genetics*, 125(2), 199–209.
<https://doi.org/10.1007/s00439-008-0612-7>.
- Lawen, A., & Lane, D. J. (2013). Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxidants & redox signaling*, 18(18), 2473–2507. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4271> (obrázek 8 na straně 30)
- Lear, S. A., Humphries, K. H., Kohli, S., Chockalingam, A., Frohlich, J. J., & Birmingham, C. L. (2007). Visceral adipose tissue accumulation differs according to ethnic background: results of the Multicultural Community Health Assessment Trial (M-CHAT). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(2), 353–359. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.2.353>

- Lee, S. L., Chau, G. Y., Yao, C. T., Wu, C. W., & Yin, S. J. (2006). Functional assessment of human alcohol dehydrogenase family in ethanol metabolism: significance of first-pass metabolism. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 30(7), 1132–1142. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00139.x>
- Li C. C. (1969). Population subdivision with respect to multiple alleles. *Annals of Human Genetics*, 33(1), 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1969.tb01625.x>.
- Li, T., Wu, K., You, L., Xing, X., Wang, P., Cui, L., Liu, H., Cui, Y., Bian, Y., Ning, Y., Zhao, H., Tang, R., & Chen, Z. J. (2013). Common variant rs9939609 in gene FTO confers risk to polycystic ovary syndrome. *PloS One*, 8(7), e66250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066250>.
- Loos, R. J., Lindgren, C. M., Li, S., Wheeler, E., Zhao, J. H., Prokopenko, I., Inouye, M., Freathy, R. M., Attwood, A. P., Beckmann, J. S., Berndt, S. I., Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial, Jacobs, K. B., Chanock, S. J., Hayes, R. B., Bergmann, S., Bennett, A. J., Bingham, S. A., Bochud, M., Brown, M., ... Mohlke, K. L. (2008). Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nature Genetics*, 40(6), 768–775. <https://doi.org/10.1038/ng.140>.
- Mahley, R. W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240(4852), 622–630. <https://doi.org/10.1126/science.3283935>
- Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., & Huang, Y. (2009). Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl(Suppl), S183–S188. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800069-JLR200>
- Marais A. D. (2019). Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology*, 51(2), 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2018.11.002>
- Musonda C. J., Grobler, C., & Oldewage-Theron, W. (2022). Genetic Polymorphisms and Their Interactions with the Risk Factors of Cardiovascular Diseases: Review Chapter. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.100486.
- Ministry of Health portal (2022, 11.13). *Khoảng 5 triệu người Việt đang mắc căn bệnh gây nhiều biến chứng về tim mạch, thần kinh, cắt cụt chi..* https://moh.gov.vn/tin-noi-bat/-/asset_publisher/3Yst7YhbkA5j/content/khoang-5-trieu-nguoi-viet-ang-mac-can-benh-gay-nhieu-bien-chung-ve-tim-mach-than-kinh-cat-cut-chi-.
- Myles, S., Hradetzky, E., Engelken, J., Lao, O., Nürnberg, P., Trent, R. J., Wang, X., Kayser, M., & Stoneking, M. (2007). Identification of a candidate genetic variant for the high prevalence of type II diabetes in Polynesians. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 15(5), 584–589. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201793>.
- Naim H. Y. (2001). Molecular and cellular aspects and regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *Histology and Histopathology*, 16(2), 553–561. <https://doi.org/10.14670/HH-16.553>.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet (London, England)*, 390(10113), 2627–2642. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32129-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3).
- Ng, M. C., Park, K. S., Oh, B., Tam, C. H., Cho, Y. M., Shin, H. D., Lam, V. K., Ma, R. C., So, W. Y., Cho, Y. S., Kim, H. L., Lee, H. K., Chan, J. C., & Cho, N. H. (2008). Implication of genetic variants near TCF7L2, SLC30A8, HHEX, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, and FTO in type 2 diabetes and obesity in 6,719 Asians. *Diabetes*, 57(8), 2226–2233. <https://doi.org/10.2337/db07-1583>

- Noordam, R., Zwetsloot, C. P. A., de Mutsert, R., Mook-Kanamori, D. O., Lamb, H. J., de Roos, A., de Koning, E. J. P., Rosendaal, F. R., Willems van Dijk, K., & van Heemst, D. (2018). Interrelationship of the rs7903146 TCF7L2 gene variant with measures of glucose metabolism and adiposity: The NEO study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, 28(2), 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.10.012>.
- Norton, L., Fourcaudot, M., Abdul-Ghani, M. A., Winnier, D., Mehta, F. F., Jenkinson, C. P., & DeFronzo, R. A. (2011). Chromatin occupancy of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) and its role in hepatic glucose metabolism. *Diabetologia*, 54(12), 3132–3142. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2289-z>.
- Norton, L., Chen, X., Fourcaudot, M., Acharya, N. K., DeFronzo, R. A., & Heikkinen, S. (2014). The mechanisms of genome-wide target gene regulation by TCF7L2 in liver cells. *Nucleic Acids Research*, 42(22), 13646–13661. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1225>.
- Packard, C. J., & Shepherd, J. (1997). Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(12), 3542–3556. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.12.3542>
- Pham, Kh. H. (2020) *Stravovací zvyklosti a životní styl ve vietnamské komunitě v ČR v porovnání s populací Vietnamu a rodilými Čechy* [Bakalářská práce]. Univerzita Karlova.
- Pietrangelo A. (2010). Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology*, 139(2), 393–408.e4082. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.013>.
- Pinhasi, R., Fort, J., & Ammerman, A. J. (2005). Tracing the origin and spread of agriculture in Europe. *PLoS Biology*, 3(12), e410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030410>.
- Povel, C. M., Boer, J. M., Reiling, E., & Feskens, E. J. (2011). Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review. *Obesity reviews : an Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 12(11), 952–967. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2011.00907.x>.
- Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y. C., Weisnagel, S. J., Argyropoulos, G., Walts, B., Pérusse, L., & Bouchard, C. (2006). The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 14(4), 529–644. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.71>
- Rasmussen, K. L., Tybjærg-Hansen, A., Nordestgaard, B. G., & Frikke-Schmidt, R. (2019). Plasma levels of apolipoprotein E, APOE genotype, and all-cause and cause-specific mortality in 105 949 individuals from a white general population cohort. *European Heart Journal*, 40(33), 2813–2824. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz402>
- Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W. M., Uda, M., Albai, G., Strait, J., Najjar, S., Nagaraja, R., Orrú, M., Usala, G., Dei, M., Lai, S., Maschio, A., Busonero, F., Mulas, A., Ehret, G. B., Fink, A. A., Weder, A. B., Cooper, R. S., Galan, P., ... Abecasis, G. R. (2007). Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genetics*, 3(7), e115. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030115>.
- Ségurel, L., & Bon, C. (2017). On the Evolution of Lactase Persistence in Humans. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 18, 297–319. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035340>.
- Shao, W., Szeto, V., Song, Z., Tian, L., Feng, Z. P., Nostro, M. C., & Jin, T. (2018). The LIM homeodomain protein ISL1 mediates the function of TCF7L2 in pancreatic beta cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 61(1), 1–12. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0181>.
- Sherman, D., & Watson, R. R. (2002). Ethanol and the Liver. *CRC Press*. <https://doi.org/10.3109/9780203301388>
- Shu, L., Matveyenko, A. V., Kerr-Conte, J., Cho, J. H., McIntosh, C. H., & Maedler, K. (2015). Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation

- of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function. *Human molecular genetics*, 24(10), 3004. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv075>.
- Schultheis, P.J. and Bowling, B.V. (2011), Analysis of a SNP linked to lactase persistence: An exercise for teaching molecular biology techniques to undergraduates. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 39: 133-140. <https://doi.org/10.1002/bmb.20456>. (obrázek 6 na straně 26)
- Simon, M., & Brissot, P. (1988). The genetics of haemochromatosis. *Journal of Hepatology*, 6(1), 116–124. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(88\)80471-9](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(88)80471-9)
- Simopoulos, A. P., & Ordovas, J. M. (Eds.). (2004). *Nutrigenetics and Nutrigenomics*. S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-01112-8>.
- Sørensen, E., Rigas, A. S., Didriksen, M., Burgdorf, K. S., Thøner, L. W., Pedersen, O. B., Hjalgrim, H., Petersen, M. S., Erikstrup, C., & Ullum, H. (2019). Genetic factors influencing hemoglobin levels in 15,567 blood donors: results from the Danish Blood Donor Study. *Transfusion*, 59(1), 226–231. <https://doi.org/10.1111/trf.15075>.
- Speakman, J. R. (2010). FTO effect on energy demand versus food intake. *Nature*, 464(7289), E1. <https://doi.org/10.1038/nature08807>.
- Speakman, J. R., Rance, K. A., & Johnstone, A. M. (2008). Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16(8), 1961–1965. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.318>.
- Speliotes, E. K., Willer, C. J., Berndt, S. I., Monda, K. L., Thorleifsson, G., Jackson, A. U., Lango Allen, H., Lindgren, C. M., Luan, J., Mägi, R., Randall, J. C., Vedantam, S., Winkler, T. W., Qi, L., Workalemahu, T., Heid, I. M., Steinthorsdottir, V., Stringham, H. M., Weedon, M. N., Wheeler, E., ... Loos, R. J. (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nature Genetics*, 42(11), 937–948. <https://doi.org/10.1038/ng.686>.
- Storhaug, C. L., Fosse, S. K., & Fadnes, L. T. (2017). Country, regional, and global estimates for lactose malabsorption in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 2(10), 738–746. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30154-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30154-1).
- Stover P. J. (2006). Influence of human genetic variation on nutritional requirements. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2), 436S–442S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.436S>.
- Tanofsky-Kraff, M., Han, J. C., Anandalingam, K., Shomaker, L. B., Columbo, K. M., Wolkoff, L. E., Kozlosky, M., Elliott, C., Ranzenhofer, L. M., Roza, C. A., Yanovski, S. Z., & Yanovski, J. A. (2009). The FTO gene rs9939609 obesity-risk allele and loss of control over eating. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(6), 1483–1488. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28439>
- Tishkoff, S. A., Reed, F. A., Ranciaro, A., Voight, B. F., Babbitt, C. C., Silverman, J. S., Powell, K., Mortensen, H. M., Hirbo, J. B., Osman, M., Ibrahim, M., Omar, S. A., Lema, G., Nyambo, T. B., Ghorri, J., Bumpstead, S., Pritchard, J. K., Wray, G. A., & Deloukas, P. (2007). Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nature Genetics*, 39(1), 31–40. <https://doi.org/10.1038/ng1946>.
- Thomsen, M., Dahl, M., Tybjærg-Hansen, A., & Nordestgaard, B. G. (2012). β 2-adrenergic receptor Thr164Ile polymorphism, obesity, and diabetes: comparison with FTO, MC4R, and TMEM18 polymorphisms in more than 64,000 individuals. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(6), E1074–E1079. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3282>
- Tschritter, O., Haupt, A., Preissl, H., Ketterer, C., Hennige, A. M., Sartorius, T., Machicao, F., Fritsche, A., & Häring, H. U. (2011). An Obesity Risk SNP (rs17782313) near the MC4R Gene Is Associated with Cerebrocortical Insulin Resistance in Humans. *Journal of Obesity*, 2011, 283153. <https://doi.org/10.1155/2011/283153>.

- Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. *Stručný přehled očinnosti oboru diabetologie a endokrinologie za období 2007 – 2017*. https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/nzis_rep_2018_K01_A004_diabet_endokrin_2017.pdf.
- Villareal, D. T., Robertson, H., Bell, G. I., Patterson, B. W., Tran, H., Wice, B., & Polonsky, K. S. (2010). TCF7L2 variant rs7903146 affects the risk of type 2 diabetes by modulating incretin action. *Diabetes*, *59*(2), 479–485. <https://doi.org/10.2337/db09-1169>.
- Voight, B. F., Kudaravalli, S., Wen, X., & Pritchard, J. K. (2006). A map of recent positive selection in the human genome. *PLoS Biology*, *4*(3), e72. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040072>.
- Wang, S., Lewis, C. M., Jakobsson, M., Ramachandran, S., Ray, N., Bedoya, G., Rojas, W., Parra, M. V., Molina, J. A., Gallo, C., Mazzotti, G., Poletti, G., Hill, K., Hurtado, A. M., Labuda, D., Klitz, W., Barrantes, R., Bortolini, M. C., Salzano, F. M., Petzl-Erler, M. L., ... Ruiz-Linares, A. (2007). Genetic variation and population structure in native Americans. *PLoS Genetics*, *3*(11), e185. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030185>.
- WHO (2021). *Cardiovascular diseases*. [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). World Health Organization
- WHO (2022). *Alcohol*. World Health Organization <http://who.int/news-room/factsheet/detail/alcohol> [Accessed 2021-06-21]. World Health Organization
- Wilfred & Chiang, Yu-Ting & Jin, Tianru. (2012). The involvement of the wnt signaling pathway and TCF7L2 in diabetes mellitus: The current understanding, dispute, and perspective. *Cell & Bioscience*. 2. 28. 10.1186/2045-3701-2-28. (obrázek 3 na straně 21)
- Yang, Q., Xiao, T., Guo, J., Su, Z. (2017). Complex Relationship between Obesity and the Fat Mass and Obesity Locus. *International Journal of Biological Sciences*, *13*(5), 615-629. <https://doi.org/10.7150/ijbs.17051> (obrázek 2 na straně 18)
- Yokoyama, A., Mizukami, T., Yokoyama, T. (2015). Genetic Polymorphisms of Alcohol Dehydrogenase-1B and Aldehyde Dehydrogenase-2, Alcohol Flushing, Mean Corpuscular Volume, and Aerodigestive Tract Neoplasia in Japanese Drinkers. In: Vasiliou, V., Zakhari, S., Seitz, H., Hoek, J. (eds) *Biological Basis of Alcohol-Induced Cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 815*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09614-8_15. (obrázek 7 na straně 28)
- Yoon, K. H., Lee, J. H., Kim, J. W., Cho, J. H., Choi, Y. H., Ko, S. H., Zimmet, P., & Son, H. Y. (2006). Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. *Lancet (London, England)*, *368*(9548), 1681–1688. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69703-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69703-1)
- Zhang A. S. (2010). Control of systemic iron homeostasis by the hemojuvelin-hepcidin axis. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, *1*(1), 38–45. <https://doi.org/10.3945/an.110.1009>.
- Zhou, Y., Kong, Y., Fan, W., Tao, T., Xiao, Q., Li, N., & Zhu, X. (2020). Principles of RNA methylation and their implications for biology and medicine. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *131*, 110731. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110731>
- Ziv, E., & Burchard, E. G. (2003). Human population structure and genetic association studies. *Pharmacogenomics*, *4*(4), 431–441. <https://doi.org/10.1517/phgs.4.4.431.22758>.

Seznam zkratek

α MSH – *α -melanocyte stimulating hormone*

AGRP – *Agouti-related protein*

ADH – *Alkohol-dehydrogenáza*

ALDH – *Aldehyd-dehydrogenáza*

ApoE – *Apolipoprotein E*

APOE – *Gen pro apolipoprotein E*

BMI – *Body mass index (Index tělesné hmotnosti)*

CEP – *Celkový energetický příjem*

CNS – *Centrální nervová soustava*

CT – *počítačová tomografie*

DHA – *Kyselina dokosahexaenová*

EPA – *Kyselina eikosapentaenová*

FTO – *Fat Mass and Obesity-associated Gen (Gen asociovaný s tukovou hmotou a obezitou)*

GLP-1R – *Glukagon-like peptide 1 receptor (Receptor pro glukagonu podobný peptid 1)*

GLUT-1 – *Glukózový transportér 1*

GWAS – *Genome-wide association studies (Celogenomové asociační studie/screeningy)*

HDL(-C) – *High Density Lipoprotein Cholesterol (cholesterol v lipoproteinových částicích s vysokou denzitou)*

HFE – *Human homeostatic iron regulator protein (Regulační protein pro homeostázu železa)*

HMG-box – *High mobility group box*

IDL(-C) – *Intermediate Density Lipoprotein Cholesterol (Cholesterol v lipoproteinových částicích se střední denzitou)*

IGF-1 – *Insulin-like growth factor (Inzulínu podobný růstový faktor)*

IKEM - *Institut klinické a experimentální medicíny*

KVO – *Kardiovaskulární onemocnění*

LCT gen – *Gen pro enzym laktázu*

LD – *Linkage disequilibrium (Vazebná nerovnováha)*

LDL(-C) – *Low Density Lipoprotein Cholesterol (Cholesterol v lipoproteinových částicích s nízkou denzitou)*

LPA – Lipoprotein A

LPH – Intestinal lactase-phlorizin hydrolase (Laktáza)

MC4R – Melanocortin 4 receptor (Receptor pro melanocortin 4)

MCM6 – Minichromosome maintenance complex component 6

OD – poměr šancí (odds ratio)

OGTT – Orální glukózový toleranční test

PCR – Polymerázová řetězová reakce

RFLP – Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

SNP - Jednonukleotidové polymorfismy

DM1T – Diabetes mellitus 1. typu

DM2T – Diabetes mellitus 2. typu

TCF-4 – Transcription factor 4 (transkripční faktor 4)

TCF7L2 – Transcription factor 7-like 2

TF – Gen kódující transferin

TfR – Receptor pro transferin

TG/TAG - Triglyceridy/Triacylglyceridy

TMPRSS6 – Transmembrane serine protease 6

TNF- α – Tumor necrosis factor α

VLDL(-C) – Very Low Density Lipoprotein Cholesterol (Cholesterol v lipoproteinových částicích s velmi nízkou denzitou)

Wnt – Wingless-related integration site

Seznam grafů

Graf 1 – Frekvence genotypů varianty rs17817449 v genu FTO	47
Graf 2 - Frekvence genotypů varianty rs7903146 v genu TCF7L2.....	48
Graf 3 - Frekvence genotypů varianty rs1229984 v genu ADH1B	50
Graf 4 - Zastoupení rizikové alely G varianty rs1799945 (H63D) v genu HFE.....	51
Graf 5 - Frekvence genotypů varianty rs498235 v genu MCM6.....	52
Graf 6 - Rozložení pohlaví a věkových skupin u vietnamských respondentů	54
Graf 7 - Rozložení pohlaví a věkových skupin u českých respondentů	55
Graf 8 - Výskyt metabolických civilizačních onemocnění.....	56
Graf 9 - Frekvence konzumace mléčných výrobků v týdenním intervalu.....	57
Graf 10 - Průměrná roční spotřeba alkoholu.....	57

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Izolace DNA	34
Tabulka 2 - Gelová elektroforóza na agaru	35
Tabulka 3 - PCR reakční směs	37
Tabulka 4 - PCR-RFLP	39
Tabulka 5 - Reakční směs pro RFLP	40
Tabulka 6 - Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu	41
Tabulka 7 - Reakční směs pro real-time PCR	43
Tabulka 8 - Úspěšnost genotypizace	46
Tabulka 9 - Genotypy varianty rs17817449 v genu FTO	47
Tabulka 10 - Genotypy varianty rs7903146 v genu TCF7L2	48
Tabulka 11 - Genotypy varianty rs17782313 v genu MC4R	49
Tabulka 12 - Genotypy varianty rs1229984 v genu ADH1B	49
Tabulka 13 - Genotypy varianty rs1799945 (H63D) v genu HFE	50
Tabulka 14 - Genotypy varianty rs1800562 (C282Y) v genu HFE	51
Tabulka 15 - Genotypy varianty rs4988235 v genu MCM6	52
Tabulka 16 - Genotypy v genu ApoE	53
Tabulka 17 - Výskyt metabolických civilizačních onemocnění	55
Tabulka 18 - Frekvence konzumace mléčných výrobků	56

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Nutrigenetika a nutrigenomika (upraveno podle Farhud et al., 2010) ..	14
Obrázek 2 - Struktura genu FTO a jeho polymorfismy (upraveno podle Yang et al., 2017)	18
Obrázek 3 - Struktura genu TCF7L2 a jeho polymorfismy (upraveno podle Wilfred et al., 2012)	20
Obrázek 4 - Funkce MC4R v energetické regulaci (upraveno podle Fani et al., 2014)	22
Obrázek 5 - gen ApoE a jeho varianty (upraveno podle Abondio et al., 2019).....	24
Obrázek 6 - LCT a MCM6 (upraveno podle Schulltheis et al., 2011).....	26
Obrázek 7 - Polymorfismy v metabolismu alkoholu (upraveno podle Yokoyama et al., 2014)	28
Obrázek 8 - Úloha genu HFE v metabolismu Fe (upraveno podle Lawen a Lane, 2013).....	30
Obrázek 9 - Gen HFE (upraveno podle de Campos et al., 2019)	31
Obrázek 10 - Výsledek PCR-RFLP na polyakrylamidovém gelu pro polymorfismus v genu ADH1B	42
Obrázek 11 - Výsledek PCR-RFLP na agarózovém gelu pro HFE-H63D	43

Seznam příloh

Příloha č. 1: Souhlas etické komise

Příloha č. 2: Informovaný souhlas k genetickému vyšetření

Příloha č. 3: Dotazník

Příloha č. 1 Souhlas etické komise

ETICKÁ KOMISE
PŘI INSTITUTU KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY
A FAKULTNÍ THOMAYEROVĚ NEMOCNICI
S MULTICENTRICKOU PŮSOBNOSTÍ
*Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and the Thomayer University
Hospital*



Vídeňská 800, 140 59 Praha 4, Czech Republic,
tel. 236 055 012, tel. 261 083 481,
e-mail: eticka.komise@ftn.cz
www.ftn.cz, www.ikem.cz



Vážený pan / *Dear Sir*
Ing. J. Hubáček, CSc., DSc.
IKEM
Víteňská 1958/9
140 21 Praha 4

Č.j./ *Docket No.* 28899/22; A-22-30

Praha/ *Prague*, 16. 11. 2022

Věc/ *Subject:* Schválení diplomové práce / *Dissertation Approval*

Etická komise s multicentrickou působností při IKEM a FTN dne 9. 11. 2022 projednala a 16. 11. 2022 schválila diplomovou práci / *The Ethics Committee with multi-center competence of the Institute for Clinical and Experimental Medicine (IKEM) and the Thomayer University Hospital (FTN), 9Nov2022 discussed and 16NOV2022 approved the dissertation*

Název diplomové práce / *Dissertation name:* Polymorfismy nutrigeneticky funkčních genů ve vietnamské a české populaci

Žadatel/ *Applicant:* Ing. J. Hubáček, CSc., DSc., IKEM Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4; jahb@ikem.cz, 261363379

Datum přijetí dokumentace / *Date of Submission of Documents:* 20. 10. 2022

Předložené a schválené dokumenty/ *Submitted and approved documents:*

- Protokol diplomové práce verze z 15.11.2022
- Informovaný souhlas
- Dotazník životního stylu

Etická komise nemá námitek/ *The Ethics Committee has no objections*

(*Stanovisko bylo vydáno po obdržení a schválení opravených dokumentů)
(**The opinion was issued after receipt and approval of the corrected documents*)


Professor Vladimír Staněk, MD, CSc.
předseda komise/ *Chairman of the Committee*



[stamp:]
Ethics Committee
- 3 -
IKEM + FTN
Víteňská 800
140 59 Praha 4 Krč

Příloha č. 2 Informovaný souhlas k genetickému vyšetření

Institut klinické a experimentální medicíny,
Videňská 1958/9, 140 21 Praha 4, tel.: +420 26136 1111, IČ 00023001



Souhlas vyšetřované/ho s genetickým laboratorním vyšetřením

Údaje o vyšetřované osobě:

Jméno a příjmení:

R.č.:

Pojišťovna:

Název studie: Polymorfismy nutrigeneticky funkčních genů ve vietnamské a české populaci.

Cíl, povaha a postup výkonu: Jedná se o laboratorní vyšetření, při kterém se zjišťuje, jakou variantou určitého genu je vyšetřovaná osoba vybavena. Materiál k vyšetření bude získán stěrem buněk bukalní sliznice.

Očekávaný přínos výkonu: Zjištění potenciální genetické predispozice k chorobě.

Rizika a komplikace výkonu: Žádná, jedná se o neinvazivní získání vzorku.

Omezení po provedeném výkonu: Žádná, jedná se o neinvazivní získání vzorku.

Alternativní možnosti výkonu: Genetické vyšetření nemá alternativu.

Doplňující otázky pacienta:

A. Prohlášení lékaře, který podal informace o vyšetření pacientovi (zákonnému zástupci)

Prohlašuji, že jsem vyšetřované/mu (zákonnému zástupci vyšetřovaného) jasně a srozumitelně vysvětlil/a účel, povahu, předpokládaný prospěch, následky i možná rizika níže uvedeného genetického laboratorního vyšetření. Rovněž jsem vyšetřovanou osobu seznámil/a s možnými výsledky a s důsledky toho, že by vyšetření nebylo možno za níže uvedeným účelem provést (nezdařilo by se) nebo by nemělo potřebnou vypovídací schopnost pro naplnění sledovaného účelu. Výsledky laboratorního vyšetření budou důvěrné a nebudou bez souhlasu vyšetřované osoby/zákonného zástupce sdělovány třetí straně, pokud platné právní předpisy neurčují jinak. Pacientovi **byl / nebyl*** vydán informační list vztahující se k požadovanému genetickému vyšetření.

Pracoviště:

Jméno lékaře: *A. Adámková*

Podpis: Dne 20.....

*nehodící se škrtněte

B. Prohlášení vyšetřované osoby

Potvrzuji, že mi byly poskytnuty informace ke genetickému laboratornímu vyšetření za účelem uvedeným v odstavci B1. Vše mi bylo sděleno a vysvětleno jasně a srozumitelně. Měl/a jsem možnost vše si řádně, v klidu a v dostatečně poskytnutém čase zvážit, měl/a jsem možnost se lékaře zeptat na vše, co jsem považoval/a za pro mne podstatné a potřebné vědět a probrat s ním vše, čemu jsem nerozuměl/a. Na ty to mé dotazy jsem dostal/a jasnou a srozumitelnou odpověď.

B. 1 Za účelem výše uvedeným souhlasím s odběrem dále uvedeného vzorku z mého těla a s provedením těchto vyšetření:

Molekulárně genetická vyšetření: Analyzovány budou běžné varianty genů potenciálně spojených výskytem civilizačních onemocnění (obezita, diabetes) a ovlivňujících některé stravovací zvyklosti (příjem mléka, železa či alkoholických nápojů).

Ze vzorku: bukální sliznice

2 Rozhodl/a jsem, že se vzorkem bude po ukončení testování naloženo takto:

- Pokud to bude možné, bude můj vzorek (vzorky) skladován pro další analýzu provedenou k mému prospěchu a prospěchu mé rodiny, ale vždy budu před dalším vyšetřením poučena a nově navrhovaná genetická laboratorní vyšetření budou provedena až s mým aktuálním informovaným souhlasem.
- Souhlasím s anonymním využitím mé DNA/RNA k lékařskému výzkumu a s tím, aby výsledky vyšetření včetně informací o mém zdravotním stavu zjištěné v souvislosti s tímto výzkumem mohly být anonymně, tedy bez uvedení jména a dalších identifikačních údajů použité pro prezentaci v odborných vědeckých kruzích či v odborných časopisech
- Můj vzorek (vzorky) bude po provedení genetického laboratorního vyšetření zlikvidován s tím rizikem, že nebude již možné v budoucnosti výsledek vyšetření v případě potřeby znovu ověřit a pro další genetické testování bude nutný nový odběr materiálu.
- Jiné:

Na základě tohoto poučení prohlašuji, že souhlasím s odběrem příslušného vzorku z mého těla a s provedením výše popsaného genetického laboratorního vyšetření s podmínkami uvedenými výše.

Jsem si vědom/a, že svůj souhlas mohu kdykoliv odvolat.
Obdržel/a jsem datovaný a podepsaný stejnopis tohoto IS.

Podpis vyšetřované osoby..... 

V *Prague*

Dne... *23/02. 2025*

Tento informovaný souhlas je vyhotoven ve dvou stejnopisech, z nichž jeden obdrží osoba odebírající vzorek a druhý vyšetřovaná osoba. Pro potřeby ostatních subjektů podílejících se na diagnostice se poskytuje lékařem potvrzená kopie.

Detailní informace o zpracování osobních údajů naleznete na webové stránce gdpr.ikem.cz

Příloha č. 3 Dotazník

*Dobrý den,
jsem studentkou 1. lékařské fakulty univerzity Karlovy. Chtěla bych Vás požádat o vyplnění krátkého dotazníku, který využiji ke zpracování mé bakalářské práce na téma Rozdíly v jídelních zvyklostech a životním stylu mezi Vietnamci a Čechy. Dotazník je zcela anonymní, nikdo (tedy ani autorka práce) Vás nebude moci dle získaných dat identifikovat, poprosím Vás proto o pravdivé vyplnění dotazníku. Také aby data bylo možné zpracovat a práce měla vypovídající hodnotu, budu Vám velice vděčná za pečlivé vyplnění celého dotazníku. Děkuji.*

Základní údaje:

1. **Pohlaví:**

- žena
- muž

2. **Věk:**

3. **Výška:**

4. **Váha:**

Socio-ekonomická situace:

5. **Vaše nejvýše dosažené vzdělání:**

- základní
- střední bez maturity
- střední s maturitou
- vysokoškolské

Zdravotní stav:

6. **Trpíte nějakým onemocněním?**

- Diabetes
- dyslipidémie
- Kardiovaskulární onemocnění (ateroskleróza, ischemická choroba srdeční, infarkt myokardu, ischemická choroba dolních končetin, ischemická cévní mozková příhoda)
- Hypertenze
- Jiné (které?):

7. Máte nějaké dietní **alergie/intolerance**? Napište prosím konkrétně jaké.

8. Stravujete se podle nějakého **alternativního směru**? (např vegetariánství, veganství,...)

Stravování:

9. **Stravujete se pravidelně?**

- ano
- ne

10. **Kolik jídel denně konzumujete:**

11. **Snidáte:**

- ano
- ne
- nepravidelně

12. **Kolik míváte denně teplých jídel?**

13. Kolikrát týdně jíte v restauraci?

- nikdy
- 1 – 2x
- 3- 5x
- 6 a vícekrát

14. Čím sladíte?

- hnědým cukrem
- bílým cukrem
- medem
- sirupem
- umělým sladidlem
- stévií

15. Dosolujete si u stolu?

- ano
- ne

16. Kolik litrů nealkoholických tekutin vypijete průměrně za den?.....l

17. Co pijete nejčastěji? (seřadit podle frekvence – očíslovat od 1 = nejčastěji k 4 = nejméně často)

- vodu
- čaj
- džus
- sladké limonády

18. Jaké druhy masa jíte? (seřadit podle frekvence – očíslovat od 1 = nejčastěji k 4 = nejméně často)

- drůbeží
- vepřové
- hovězí
- ryby

19. Jaké mléčné výrobky konzumujete (seřadit podle frekvence – očíslovat od 1 – nejčastěji k 5):

- tvrdé sýry
- tavené sýry
- tvaroh
- jogurt
- kefir

20. Z technologických úprav jídel preferujete? (seřadit podle frekvence – očíslovat od 1 – nejčastěji k 5)

- vaření
- smažení
- grilování

- dušení / vaření v páře / ve vodní lázni
- pečení

Životní styl

21. **Kouříte?**

- ano
- nikdy jsem nekouřil(a)
- bývalý kuřák

22. **Kolik cigaret denně** v průměru kouříte? Pokud jste nikdy nekouřil(a), tuto otázku prosím přeskočte.

23. **Pijete alkohol?** Pokud ho pijete, jak často ho pijete? (Označte, prosím, možnost, která Vaši konzumaci daného alkoholického nápoje nejvíce vystihuje).

	Nikdy	1x- 3x/ rok	1-3x/ měsíc	1x/ týden	2-4x/ týden	Každý den
<i>Pivo</i>						
<i>Víno</i>						
<i>Destiláty</i>						

24. **Jaké množství alkoholu pijete?**

	Průměrné množství vypitého alkoholu při každé konzumaci (v ml)
<i>Pivo</i>	
<i>Víno</i>	
<i>Destiláty</i>	

25. **Pijete denně kávu?**

- ano
- ne

27. **Je vaše práce/zaměstnání převážně:**

- sedavá
- fyzická
- kombinace obojího

26. **Kolik šálků kávy denně pijete?**

28. **Děláte nějaký sport, případně nějaký druh pohybové aktivity (alespoň na 20 minut):**

- každý den
- 2 – 3x týdně
- 1x týdně
- 1 – 2x za měsíc
- Vůbec

29. **Kolik hodin denně spíte?**

Frekvenční dotazník:

Tabulka frekvence konzumace jídel:

Zaznamenejte, prosím, do tabulky jak často jednotlivé potraviny průměrně konzumujete.

Druh potraviny	Každý den	4-6x/týden	2-3x/týden	1x/týden	1x/měsíc	Výjimečně (1x/čtvrt roku - 1x/rok)	Nikdy
<i>Maso</i>							
<i>Ryby</i>							
<i>Zelenina</i>							
<i>Ovoce</i>							
<i>Mléko a mléčné výrobky</i>							
<i>Smažená jídla</i>							
<i>Sladkosti</i>							
<i>Slané trvanlivé výrobky *</i>							
<i>Bílé pečivo</i>							

Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta

Kateřinská 32, Praha 2

Prohlášení zájemce o nahlédnutí do závěrečné práce absolventa studijního programu uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy.

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům, ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

Příjmení, jméno (hůlkovým písmem)	Číslo dokladu totožnosti vypůjčitele (např. OP, cestovní pas)	Signatura závěrečné práce	Datum	Podpis