

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Tereza Svobodová

**Vliv genetického pozadí a faktorů životního stylu na rozvoj nadváhy a obezity
průřezová a longitudinální studie českých adolescentů**

The influence of genetic background and lifestyle factors on the development of overweight
and obesity – a cross-sectional and longitudinal study of Czech adolescents

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Markéta Vaňková, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.12. 2024

Bc. Tereza Svobodová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Markétě Vaňkově, Ph.D. za veškerý čas, který mi při zpracování práce věnovala, za cenné rady, odborné vedení, lidský přístup a za uvedení do světa výzkumné činnosti. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Josefu Včelákovi za trpělivost a ochotu poskytnutou při mých laboratorních začátcích a všem členům Oddělení molekulární endokrinologie Endokrinologického ústavu v Praze za vytvoření milého pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji svým rodičům, bratrovi, partnerovi a přátelům, kteří mi byli po celou dobu studia oporou.

Abstrakt

Obezita je komplexní multifaktoriální onemocnění, které představuje jeden z největších zdravotních problémů současnosti. Prevalence nadváhy a obezity celosvětově stále narůstá jak u dospělé, tak i u dětské populace. Nadměrná hmotnost v raném věku může být spojena s dalšími metabolickými komplikacemi a většina obézních dětí zůstává obézních i v dospělosti, což se pojí s dalšími zdravotními riziky. Navzdory dlouhodobému a intenzivnímu výzkumu příčin a mechanismů vedoucích k rozvoji nadměrné tělesné hmotnosti, zůstávají některé aspekty tohoto onemocnění stále neobjasněné.

Diplomová práce sestává ze dvou samostatných studií, které reprezentují možné přístupy ve výzkumu genetického pozadí obezity.

První část práce představuje průřezová studie 1947 českých adolescentů, u kterých byla provedena asociační studie zjišťující efekt sportovní aktivity na tělesné složení a metabolické zdraví. Hodnocen byl také vliv polymorfismu rs686989 v genu *ZBTB16* na vybrané antropometrické a biochemické parametry související s nadváhou a obezitou. Získané výsledky svědčí o pozitivním vlivu sportovní aktivity na některé antropometrické a metabolické parametry u chlapců i u dívek v adolescentním věku, nicméně s jistými pohlavně specifickými rozdíly. Kromě toho bylo zjištěno, že polymorfismus rs686989 v genu *ZBTB16* pravděpodobně má určitý efekt na antropometrické a biochemické parametry, i když tento efekt je velmi jemný.

Druhou část práce tvoří longitudinální studie, ve které bylo využito techniky masivního paralelního sekvenování exomu za účelem identifikace variant potenciálně asociovaných s polygenní obezitou v souboru pacientů s podezřením na monogenní obezitu. Frekvence nalezených variant byla následně zjišťována v tzv. skupině osob se zvýšeným rizikem obezity a ve skupině nerizikových jedinců. Frekvence nalezených variant se mezi skupinami rizikových a nerizikových jedinců signifikantně nelišila.

Diplomové práce dokládá různorodost etiopatogeneze polygenní obezity i výzkumu jejích příčin.

Klíčová slova: polygenní obezita, sportovní aktivita, *ZBTB16*, celoexomové sekvenování, COPAT

Abstract:

Obesity is a complex multifactorial disease and one of the most significant health challenges of our time. The prevalence of overweight and obesity continues to rise globally in both adults and children. Excess body weight in early life is often associated with additional metabolic complications, and most obese children remain obese into adulthood, which brings further health risks. Despite intensive research into the causes and mechanisms leading to the development of excessive body weight, certain aspects of this condition remain unclear.

This thesis consists of two separate studies representing possible approaches to the investigation of the genetic background of obesity.

The first part of the thesis presents a cross-sectional study of 1,947 Czech adolescents, which involved an association study examining the effect of physical activity on body composition and metabolic health. The study also evaluated the impact of the rs686989 polymorphism in the *ZBTB16* gene on selected anthropometric and biochemical traits related to overweight and obesity. The results demonstrate a positive influence of physical activity on certain anthropometric and metabolic traits in both male and female adolescents, albeit with some gender-specific differences. Additionally, it was found that the rs686989 polymorphism in the *ZBTB16* gene may have a modest effect on anthropometric and biochemical parameters, although this effect is very subtle.

The second part of the work consists of a longitudinal study in which the technique of massive parallel exome sequencing was used to identify variants potentially associated with polygenic obesity in a group of patients with suspected monogenic obesity. The frequency of the identified variants was subsequently analyzed in a group of individuals with higher risk of obesity and compared to a group of non-risk individuals. The frequency of the identified variants did not differ significantly between the two groups.

The thesis demonstrates the diversity of the etiopathogenesis of polygenic obesity and the challenges in its research.

Key words: polygenic obesity, sport activity, *ZBTB16*, whole exome sequencing, COPAT

Obsah

1 Úvod.....	11
2 Nadváha a obezita u dětí a adolescentů.....	1
2.1. Prevalence nadváhy a obezity u dětí a adolescentů.....	1
2.2. Diagnostika nadměrné hmotnosti u dětí a adolescentů	5
2.3. Etiopatogeneze obezity.....	8
2.3.1.Faktory prostředí	8
2.3.2.Socioekonomické faktory.....	9
2.3.3.Psychologické faktory	9
2.3.4.Genetické faktory	10
3 Výzkum genetického pozadí obezity	10
3.1. Vazebná analýza a celogenomové skeny	11
3.2. Asociační studie kandidátních genů obezity	11
3.3. Celogenomové asociační studie	12
3.4. Celogenomové a celoexomové sekvenování.....	16
3.5. Animální studie	17
3.6. ZBTB16 (zinc finger and BTB domain containing 16)	18
4 Hypotézy a cíle.....	21
5 Soubor – průřezová studie.....	23
6 Metody – průřezová studie	24
6.1. Antropometrická část a klinická část.....	24
6.2. Biochemická část.....	25
6.3. Dotazníková část – sportovní aktivita	26
6.4. Genotypizace vybraného polymorfismu v genu <i>ZBTB16</i>	27
6.5. Statistická analýza	27
7 Výsledky – průřezová studie	28
8 Soubor – longitudinální studie	45

9 Metody – longitudinální studie	47
9.1. Sekvence exomů jedinců s podezřením na monogenní obezitu	47
9.1.1. Příprava DNA knihoven	47
9.1.1.1. Izolace DNA	48
9.1.1.2. Změření koncentrace vstupní DNA	48
9.1.1.3. Ředění vstupní DNA	49
9.1.1.4. Fragmentace DNA	49
9.1.1.5. Připojení adaptérů	50
9.1.1.6. Přečištění magnetickými kuličkami	50
9.1.1.7. PCR amplifikace	51
9.1.1.8. Přečištění PCR produktů	52
9.1.1.9. Kontrola kvality knihoven	52
9.1.1.10. Příprava knihoven na hybridizaci	53
9.1.1.11. Hybridizace	54
9.1.1.12. Navázání produktů hybridizace k streptavidinovým kuličkám	54
9.1.1.13. PCR amplifikace	55
9.1.1.14. Přečištění PCR produktů	56
9.1.1.15. Výsledná kontrola kvality připravených knihoven	56
9.1.2. Sekvence	56
9.2. Sekvence DNA jedinců ze souboru COPAT	57
10 Zpracování dat	58
11 Výsledky – longitudinální studie	62
12 Diskuze	64
13 Závěr	73
14 Seznam použité literatury	74
14.1. Internetové zdroje	83

Seznam zkratek

ADCY3	Adenylate Cyclase 3
AGRP	Agouti Related Neuropeptide
AIC	Akaikovo informační kritérium
ANOVA	Analysis Of Variance (analýza rozptylu)
ANCOVA	Analysis Of Covariance (analýza kovariance)
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BMI	Body Mass Index
BTB/POZ	Bric a brac-Tramtrack-Broad complex/Poxvirus and Zinc-finger
CARTPT	CART Prepropeptide
CAV	Celostátní antropologický výzkum dětí a mládeže
COPAT	Childhood Obesity Prevalence and Treatment
COSI	Childhood Obesity Surveillance Initiative
dNTPs	2'-deoxynukleosid 5'-trifosfates
FTO	Fat-mass and Obesity associated protein)
GCG	Glucagon
GIANT	Genetic Investigation for Anthropometric Traits
GLM	Generalized Linear Model (obecný lineární model)
GNAS	GNAS Complex Locus
GWAS	Genome-Wide Association Studies (celogenomová asociační studie)
GWLS	Genome-Wide Linkage Scans (celogenomové skeny)
HDL	High-density lipoprotein (vysokodenzitní lipoprotein)

INSIG2	Insulin-induced Gene 2
IRX3	Iroquois Homeobox 3
KCNJ13	Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 13
LDL	Low-density lipoprotein (nízkodenzitní lipoprotein)
LEP	Leptin
LEPR	Leptinový receptor
MC4R	Melanocortin 4 Receptor
NCD-RisC	Non-communicable Diseases Risk Factor Collaboration
NGS	Next Generation Sequencing (sekvenování nové generace)
NME7	Nucleoside Diphosphate Kinase 7
NPY	Neuropeptide Y
NTRK2	Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 2
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
TE pufr	Tris/EDTA pufr
PCSK1	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1
PLZF	Promyelocytic Leukemia Zinc Finger
POMC	Proopiomelanocortin
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
SH2B1	SH2B Adaptor Protein 1
SHBG	Sex Hormone Binding Globulin

SIM1	SIM bHLH Transcription Factor 1
RD2	Repressor Domain 2
SDS	Standard Deviation Score (skóre směrodatné odchylky)
T2DM	Type 2 Diabetes Mellitus (diabetes mellitus 2. typu)
UCP3	Uncoupling Protein 3
WHO	World Health Organisation (Světová zdravotnická organizace)
WHR	Waist to Hip Ratio
WHtR	Waist to Height Ratio
ZBTB16	Zinc Finger and BTB Domain Containing 16

1 Úvod

Obezita je komplexním multifaktoriálním onemocněním představující jeden z největších zdravotních problémů současnosti. Navzdory dlouhodobému a intenzivnímu výzkumu příčin a mechanismů vedoucích k rozvoji nadměrné tělesné hmotnosti, zůstávají některé aspekty tohoto onemocnění stále neobjasněné.

Prevalence nadváhy a obezity celosvětově stále narůstá jak u dospělé, tak i u dětské populace. Nadměrná hmotnost v raném věku může být spojena s dalšími metabolickými komplikacemi, jako je diabetes mellitus 2. typu (Young et al., 2000), hypertenze (Moore et al., 2006) a dyslipidémie (Elmaoğulları et al., 2015). Kromě toho většina obézních dětí zůstává obézních i v dospělosti, což se pojí s dalšími zdravotními riziky (Simmonds et al., 2016). Jedinci s obezitou přetrvávající z dětství do dospělosti vykazují vyšší morbiditu a mortalitu než ti, u nichž se obezita rozvine až v dospělosti (Llewellyn et al., 2016).

Genetické pozadí má v etiopatogenezi obezity významnou roli. S rozvojem molekulárně-genetických technik byly již odhaleny stovky kandidátních genetických variant, které mohou ovlivňovat vznik a rozvoj nadměrné hmotnosti. Nalezené varianty však v současnosti vysvětlují pouhých 5–6 % interindividuální variability v náchylnosti k rozvoji obezity (Trang & Grant, 2023). Úspěchy v poznání genetického pozadí obezity mohou být přínosné pro vývoj nových léčebných prostředků nebo pro účinnější prevenci.

Předkládaná diplomová práce zahrnuje dvě samostatné studie, které reprezentují možné přístupy ve výzkumu genetického pozadí obezity.

Průřezová studie je typem asociační studie a byla zaměřena na hodnocení sportovní aktivity na tělesné složení a metabolické zdraví u dětí a adolescentů. Hodnotila také vliv polymorfismu rs686989 v genu *ZBTB16* na vybrané antropometrické a biochemické parametry související s nadváhou a obezitou.

Longitudinální studie byla zaměřená na hledání nových kandidátních variant pro nadměrnou hmotnost s využitím technik masivního paralelního sekvenování exomu u osob se zvýšeným rizikem obezity.

2 Nadváha a obezita u dětí a adolescentů

Světová zdravotnická organizace (*World Health Organization*, WHO) obezitu definuje jako nadměrné zmnožení tukové tkáně, které může mít negativní dopady na zdraví jedince. Společně s nadváhou, která představuje mírnější formu zvýšené tělesné hmotnosti, představují jeden nejvýznamnějších zdravotních problémů 21. století (URL1).

Zatímco dříve byla nadváha a obezita v dětském věku výsadou především ekonomicky vyspělých zemí, trendy posledních let ukazují na výrazný nárůst počtu dětí s obezitou také v rozvojových zemích. Problematika nadměrné tělesné hmotnosti tak představuje globální problém (Abarca-Gómez et al., 2017).

Obezita v dětském věku je, stejně jako u dospělých, spojena s výskytem různých komorbidit, mezi něž patří hypertenze (Moore et al., 2006), porucha glukózové tolerance, diabetes mellitus 2. typu (T2DM) (Young et al., 2000), nealkoholové postižení jater (Anderson et al., 2015), astma (Black et al., 2013), dyslipidémie (Elmaogullari et al., 2015) a spánková apnoe (Bazzano et al., 2016). U dětí s obezitou je také častěji pozorována deficienze vitamínu D a železa (Malden et al., 2021).

Děti a adolescenti trpící obezitou mají až pětkrát vyšší pravděpodobnost výskytu obezity v dospělém věku (Simmonds et al., 2016). S tím se pojí i přetrvávající výskyt komorbidit a zvýšená nemocnost a úmrtnost těchto jedinců (Llewellyn et al., 2016). Kromě toho představuje obezita v dospělosti rizikový faktor rozvoje kardiovaskulárních onemocnění (Singh & Shen, 2013), chronických onemocnění ledvin (Wang et al., 2008), onkologických onemocnění (De Rubeis et al., 2019), onemocnění pohybového aparátu (Nicholls et al., 2012) a poruch plodnosti (Jahangir et al., 2024)

2.1. Prevalence nadváhy a obezity u dětí a adolescentů

Nejaktuálnější údaje o prevalenci nadváhy a obezity v dětském věku udává WHO, podle níž v roce 2022 trpělo nadváhou nebo obezitou 37 milionů dětí mladších 5 let. Ve stejném roce počty dětí a adolescentů (5–19 let) s nadváhou dosahovaly více než 390 milionů a z toho 160 milionů trpělo obezitou (URL1).

Globální trendy v prevalenci obezity za posledních 30 let analyzovala iniciativa NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Srovnáním dat prevalence z roku 2022 s daty z roku 1990

se ukázalo, že u dětí a adolescentů vzrostla celosvětově prevalence obezity z 3,8 % na 16,2 % (Phelps et al., 2024). K nárůstu prevalence obezity došlo ve většině z 200 sledovaných zemí a ve většině zemí byl nárůst více než dvojnásobný. Největší nárůst prevalence obezity byl jak u chlapců, tak u dívek zaznamenán ve státech Polynésie, Mikronésie a Karibiku a dále v Bruneji a Chile. Jediným státem, kde došlo ke snížení prevalence obezity u obou pohlaví byl Kyrgyzstán (Phelps et al., 2024). Závěry studie potvrdily dlouhodobý trend, kdy nárůst prevalence obezity, dříve typický pro vysokopříjmové státy, postihuje stále častěji i středněpříjmové a nízkopříjmové země. Například ve státech Latinské Ameriky, jižní Afriky a jihovýchodní Asie dochází u dětské populace k rychlému přechodu z kategorie podvýživy až k nadváze a obezitě (Abarca-Gómez et al., 2017).

V České republice máme díky šesti Celostátním antropologickým výzkumům dětí a mládeže (CAV), které proběhly v desetiletých intervalech v letech 1951–2001, unikátní data o prevalenci nadváhy a obezity u jedinců ve věku 0–18 let. Níže popsané procentuální podíly dětí a adolescentů s nadváhou a obezitou vycházejí z referenčních údajů konstruovaných v CAV 1991 platných pro českou populaci. Pro potřeby mezinárodního srovnání jsou hodnoty uváděny dle mezinárodně doporučených referenčních údajů (Vignerová et al., 2006).

Poslední výsledky z roku 2001 ukazují u chlapců, ve srovnání s výsledky z roku 1991, zvýšení prevalence obezity ve všech věkových kategoriích (Vignerová et al., 2006). Podle publikace autorů Vignerová et al. (2006), ve které jsou shrnuty výsledky 6. CAV, podíl obézních chlapců v adolescentním věku (11–17,99 let) dosahoval celkem 9,2 %. Konkrétně ve věkové kategorii 11–14,99 let byl podíl obézních chlapců 5,6 % a v kategorii 15–17,99 let 3,6 %. Chlapců s nadváhou v adolescentním věku bylo v roce 2001 celkem 15,2 %, přičemž ve věkové kategorii 15–17,99 let bylo pozorováno snížení prevalence nadváhy oproti roku 1991 na 5,9 %. U chlapců ve věku od 11 do 14,99 let pak prevalence nadváhy narostla na 9,3 % (Vignerová et al., 2006).

Prevalence obezity u dívek se dle 6. CAV (Vignerová et al., 2006) oproti roku 1991 v roce 2001 zvýšila v celém věkovém spektru s výjimkou nejstarší skupiny (15–17,99 let). U této věkové skupiny bylo pozorováno snížení prevalence obezity na 2,5 %. V kategorii 11–14,99 let pak trpěla obezitou 4,4 % dívek a celkový podíl obézních dívek v adolescentním věku tak dosahoval 6,9 %. Nadváhou v adolescentním věku v roce 2001 trpělo celkem 13,8 % dívek a stejně jako v případě obezity, bylo u nejstarší dívčí věkové kategorie pozorováno snížení prevalence,

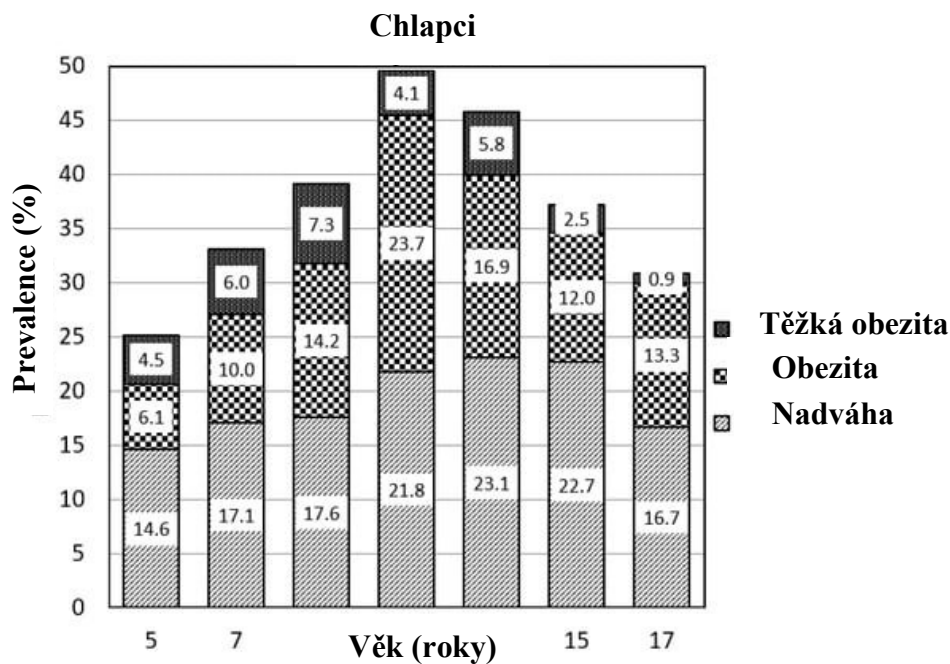
konkrétně na 6 %. Podíl adolescentek s nadváhou ve věku od 11 do 14,99 tak dosahoval let 7,8 % (Vignerová et al., 2006).

Po posledním CAV v roce 2001 bylo provedeno několik dalších epidemiologických studií zaměřených na prevalenci obezity v dětské populaci (Kunesova et al., 2020; Sigmund et al., 2020). Česká republika se od roku 2007 až do současnosti aktivně účastní iniciativy WHO Europe s názvem *Childhood Obesity Surveillance Initiative* (COSI), která si klade za cíl dlouhodobý sběr standardizovaných dat o prevalenci nadváhy a obezity dětí ve věku 6–9 let. V České republice je sběr dat zaměřen na děti ve věku 6,5–7,99 let. Data ze čtvrtého kola COSI probíhajícího v letech 2015–2017 naznačila, že celková prevalence nadváhy a obezity u sedmiletých dětí v České republice zůstává již od začátku sledování v roce 2007 stabilní. U chlapců byl zaznamenán mírný posun z kategorie nadváhy k obezitě, konkrétně, dle českých referenčních hodnot mělo v roce 2016 nadváhu celkem 14,1 % sedmiletých dětí, z toho 7,6 % tvořili chlapci a 6,5 % dívky. Obezita byla zjištěna celkem u 15,3 % sedmiletých dětí, z toho 8,8 % představovali chlapci a 6,5 % dívky (Kunesova et al., 2020).

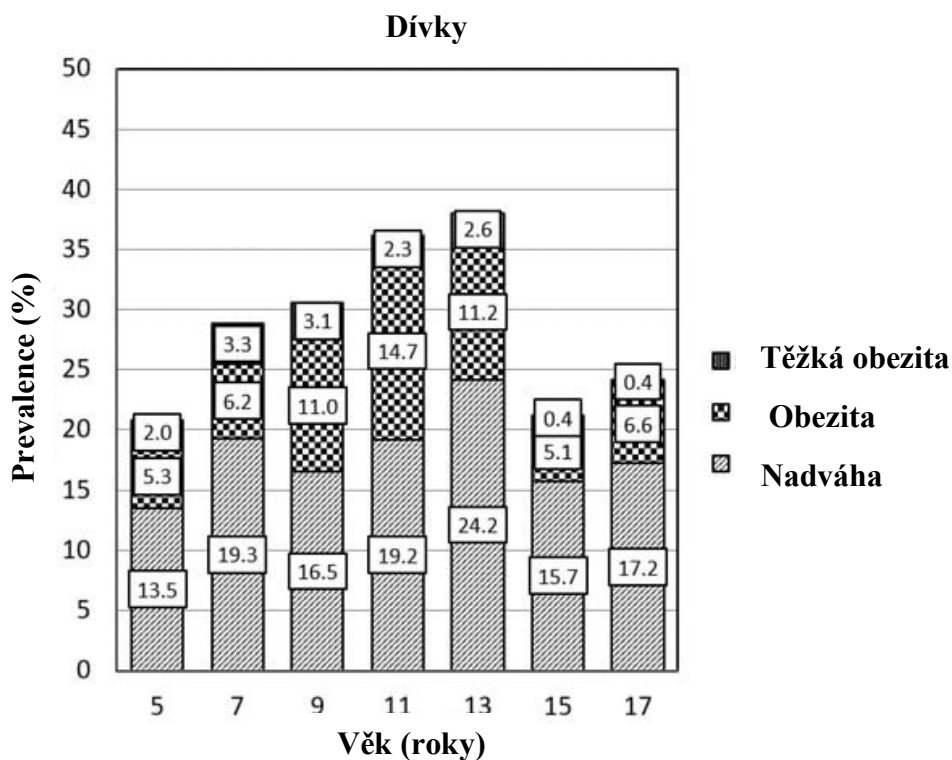
Koncem roku 2019 se na různých místech světa objevila první ohniska nemoci COVID-19, která brzy přerostla v pandemii a vážně ovlivnila životní styl většiny světové populace (URL2). V České republice byly první případy onemocnění COVID-19 zaznamenány počátkem roku 2020, což přimělo úřady k zavedení přísných epidemických opatření včetně uzavření škol a volnočasových zařízení. Česká republika držela školy zavřené nejdéle ze všech členských států Evropské unie. Od března 2020 do května 2021 byly školy uzavřeny celkem 38 týdnů, z toho 18 týdnů zcela a 20 týdnů částečně, kdy mohli výuku navštěvovat pouze žáci mateřských škol a nižších ročníků (Vážná et al., 2022).

To, jak se tato restriktivních opatření projevila na prevalenci nadváhy a obezity u českých dětí a adolescentů, sledovala studie Vážná et al. (2022). Srovnáním záznamů z pediatrických prohlídek z let 2019 a 2021 byl pozorován významný nárůst ve skóre směrodatné odchylky indexu tělesné hmotnosti (*Standard Deviation Score Body Mass Index*, SDS BMI, viz kap. 2.2.) u chlapců i u dívek ve věku 7, 9, 11 a 13 let. Nejvyšší prevalence nadváhy a obezity byla v roce 2021 zaznamenána u chlapců i dívek ve věkových kategoriích 11 a 13 let. Velmi významným zjištěním byl také zaznamenaný podíl dětí s těžkou obezitou ($BMI > 3 SD$), především chlapců ve věku 9 a 11 let (Vážná et al., 2022). Přehled podílu chlapců a dívek s nadváhou, obezitou a těžkou obezitou v jednotlivých věkových kategoriích zobrazují obrázky 1 a 2. V tuto chvíli

se jedná o nejaktuálnější publikovaná data o prevalenci nadváhy a obezity napříč těmito věkovými kategoriemi v České republice (Vážná et al., 2022).



Obr.1: Prevalence nadváhy, obezity a těžké obezity u chlapců v roce 2021 (Vážná et al., 2022)



Obr.2: Prevalence nadváhy, obezity a těžké obezity u dívek v roce 2021 (Vážná et al., 2022)

2.2. Diagnostika nadměrné hmotnosti u dětí a adolescentů

Základním a celosvětově uznávaným nástrojem pro hodnocení hmotnosti je BMI, které představuje poměr mezi tělesnou hmotností jedince v kilogramech a druhou mocninou tělesné výšky jedince v metrech (URL1).

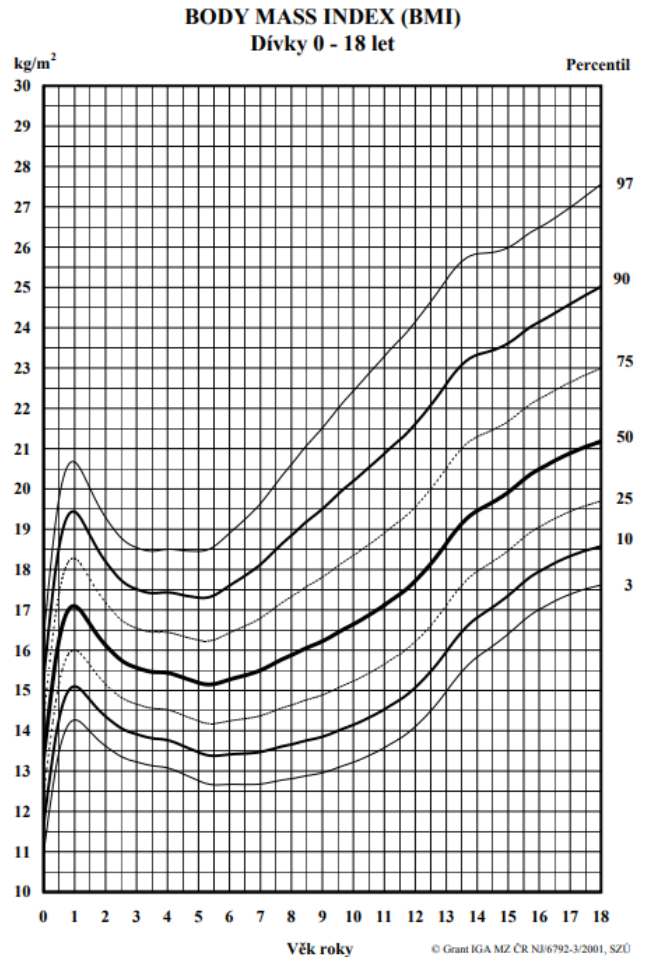
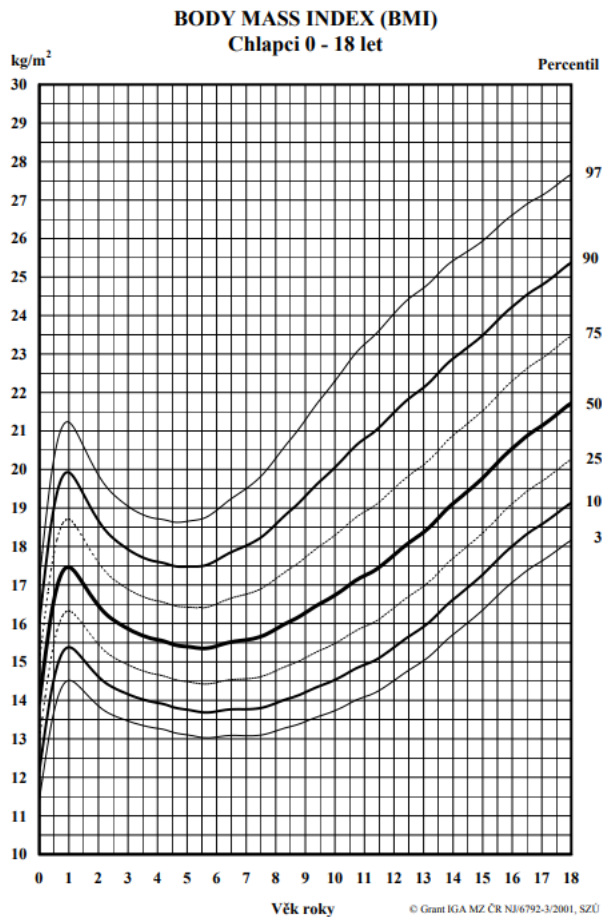
Výpočet BMI je univerzálně využíván pro diagnostiku nadměrné hmotnosti u dospělých osob. Podle WHO je za nadváhu u dospělých jedinců považována hodnota $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ a za obezitu hodnota $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ (URL1).

Diagnostika nadváhy a obezity v dětském věku je však odlišná. Hodnoty BMI se v dětství výrazně mění s věkem a důležité pro hodnocení je také zohlednění pohlaví jedinců. Proto se pro hodnocení hmotnosti u pediatrické populace využívají pohlavně specifické percentilové grafy BMI vycházející z epidemiologických studií na konkrétních populacích (Vignerová et al., 2006).

V České republice se využívají percentilové grafy BMI odvozené z dat 4–5 % populace ve věku 0–18 let získaných při 5. CAV v roce 1991 (Vignerová et al., 2006). Pro využití v pediatrické praxi není do budoucna v plánu jejich aktualizace, aby tak nedocházelo ke zjemňování normy a posunu mezních hodnot pro určení nadváhy a obezity k vyšším hodnotám (Sedlak et al., 2014). Percentilové grafy pro chlapce a dívky zobrazuje obrázek 3, kategorizaci hmotnostních pásem pro hodnocení BMI v dětském věku pro Českou republiku zobrazuje tabulka 1.

Tab. 1: Hodnocení hmotnosti podle percentilových pásem v dětském věku. Upraveno dle Vignerová et al. (2006)

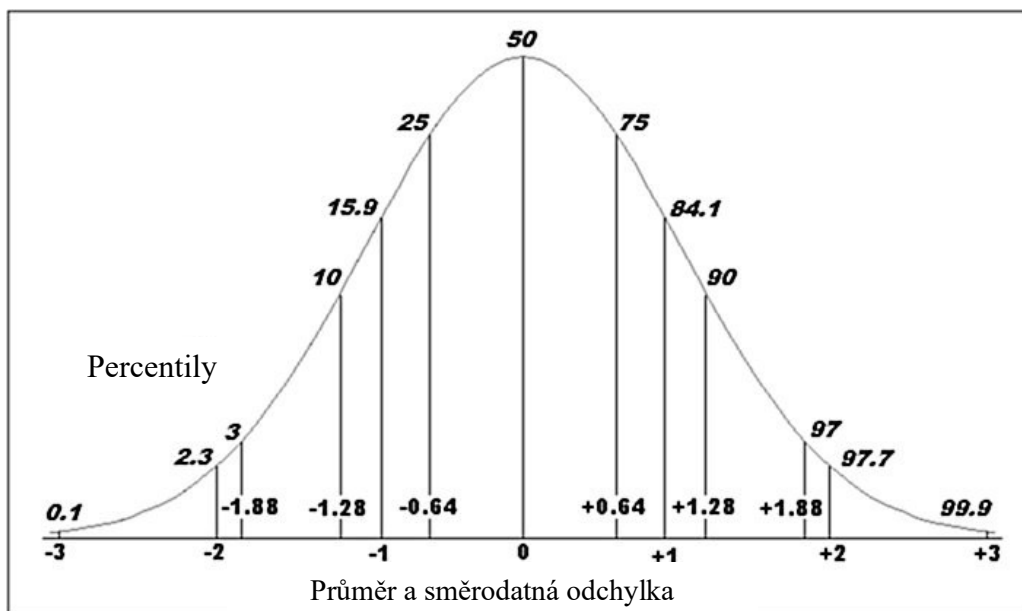
Percentilové pásmo	Hodnocení dítěte
< 10. percentil	Nízká hmotnost
> 10.–25. percentil	Štíhlost
> 25.–75. percentil	Normální hmotnost
> 75.–90. percentil	Zvýšená hmotnost
> 90.–97. percentil	Nadváha
> 97. percentil	Obezita



Obr.3: Percentilové grafy BMI pro chlapce a dívky. Převzato z (URL3)

Z hlediska hodnocení hmotnosti v dětském věku pak samostatnou kategorií představují děti do 5 let věku, u kterých se pro hodnocení hmotnosti doporučuje využívat hmotnostně–výškový poměr (Vignerová et al., 2006).

Kromě percentilových grafů BMI je pro hodnocení hmotnosti využíváno také SD-skóre BMI. Toto skóre vyjadřuje, do jaké míry se hmotnost jedince odchyluje od populační normy. V praxi je SD-skóre využíváno především pro určení míry extrémních odchylek od normy, které nelze vyjádřit percentilovou sítí (pod 3. a nad 97. percentilem). Třetí percentil odpovídá -2 SDS a 97. percentil $+2$ SDS. Na 50. percentilu se nachází nulová hodnota SDS. Vztah percentilových hodnot vůči SD je zobrazen na obrázku 4. Z důvodu zohlednění věkových a pohlavních rozdílů představuje také vhodný nástroj při zpracování dat klinických souborů (URL4).



Obr.4: Vztah percentilových hodnot k hodnotám směrodatné odchylky (SD). Převzato z URL4.

SD-skóre se vypočítá následovně:

$$SDS = \frac{\text{naměřený parametr} - \text{průměrná hodnota parametru pro daný věk a pohlaví}}{\text{směrodatná odchylka tabelovaného průměru parametru pro daný věk a pohlaví}}$$

Výpočtem SD-skóre získáme informaci o tom, o kolik směrodatných odchylek se hodnocený parametr liší od jeho průměrné tabelované hodnoty (URL4).

Nadváze odpovídá $SDS \text{ BMI} \geq 1$ a < 2 , obezitě $SDS \text{ BMI} \geq 2$ a < 3 a těžké obezitě pak $SDS \text{ BMI} \geq 3$ (URL1).

Percentilové grafy BMI a SDS BMI jsou cenným nástrojem pro sledování tělesné hmotnosti a jejího vývoje v populačních studiích. Nicméně při individuální diagnostice mohou mít v některých případech omezenou spolehlivost. Z podstaty výpočtu v sobě BMI nezohledňuje distribuci tělesného tuku nebo podíl množství svalové hmoty a tukové tkáně. To může vést k nadhodnocení hodnoty BMI u dětí s velkým podílem svalové hmoty (Javed et al., 2015; Kumar & Kelly, 2017). Opačný případ představují osoby s tzv. latentní formou obezity. U těchto osob sice hodnota BMI odpovídá normě, ale to je dáno nízkým zastoupením svalové hmoty a vysokým zastoupením tukové tkáně v těle. I tato forma obezity pro postižené osoby představuje zdravotní rizika a je proto důležité ji včas diagnostikovat (Sedlak et al., 2015, 2017).

Jednoduchým a nenákladným způsobem zpřesnění diagnostiky nadváhy a obezity je měření obvodových parametrů, jako jsou obvod pasu, obvod břicha a obvod boků. Změřené parametry

je možné využít pro výpočet indexů WHR (waist to hip ratio) nebo WHtR (waist to height ratio), které lépe vypovídají o rozložení tuku v těle a případné abdominální obezitě. Kaliperační metoda měření tloušťky kožních řas představuje také ukazatel odrážející množství podkožního tuku. Přesnými, ale ekonomicky nákladnými metodami stanovení tělesného složení jsou výpočetní tomografie, digitální rentgenová absorpciometrie, či magnetická rezonance. Ekonomicky dostupnou alternativou pro využití v běžné praxi pak může být bioimpedanční analýza (Vignerová et al., 2006).

2.3. Etiopatogeneze obezity

Z etiopatogenetického hlediska můžeme obezitu rozdělit do několika kategorií. Více než 90 % případů obezity tvoří běžná, multifaktoriálně podmíněná obezita, menší podíly pak představují vzácnější formy, jako je obezita navozená léky či endokrinně podmíněná obezita a dále velmi vzácné případy monogenní obezity nebo některé genetické syndromy doprovázené obezitou (Diels et al., 2020).

Běžná obezita vzniká v důsledku interakce faktorů vnějšího prostředí na genetickém pozadí. Mezi faktory vnějšího prostředí patří zejména jídelní a pohybové zvyklosti nebo socioekonomické a psychologické faktory (Weihrauch-Blüher & Wiegand, 2018). Běžná obezita je polygenní onemocnění, tzn. že genetickou složku představuje více genů s malým účinkem (Diels et al., 2020).

2.3.1. Faktory prostředí

Rizikové faktory prostředí jsou poměrně dobře známé. Hlavní příčinou nadměrné hmotnosti většiny dětí a adolescentů je dlouhodobá pozitivní energetická bilance, která je způsobená nízkou fyzickou aktivitou a nevhodnými stravovacími návyky.

Nízká fyzická aktivita nezahrnuje pouze nedostatek sportovní aktivity, ale také pokles rutinních manuálních denních úkonů a sedavý způsob života, který je u dětí a mladistvých podpořen časem stráveným u obrazovky (Lee & Yoon, 2018). Jako prevenci nadměrné hmotnosti dětí a adolescentů doporučuje WHO alespoň 60 minut středně intenzivní až intenzivní pohybové aktivity denně (URL5). Dodržováním tohoto doporučení u českých adolescentů se zabývala studie Salonna a kol. (2023), v rámci které bylo zjištěno že doporučených hodnot denně dosáhne pouze 20,6 % českých chlapců a 15,8 % dívek a tyto hodnoty s věkem dále klesají.

Zatímco v 11 letech alespoň 23,9 % adolescentů vykoná nejméně hodinu pohybové aktivity denně, v 15 letech už je to jen 8,4 % (Salonna et al., 2023).

Mezi nevhodné stravovací návyky patří nadměrná konzumace potravin s vysokou energetickou hodnotou, vynechávání snídaně, nedostatečná konzumace ovoce a zeleniny a konzumace sladkostí častěji než třikrát týdně (Poorolajal et al., 2020). Na význam konzumace pokrmů fast foodových restaurací jako rizikového faktoru poukázala britská studie, která zjistila vyšší hodnoty BMI a tělesného tuku u dětí žijících v blízkosti fast foodových restaurací. Podobně negativní efekt byl pozorován také v případě, kdy se fast foodové restaurace nacházejí v blízkosti škol (Libuy et al., 2024).

2.3.2. Socioekonomické faktory

Významným ukazatelem socioekonomického statusu ovlivňujícího tělesnou hmotnost dětí je vzdělání rodičů. Nižší vzdělání rodičů je u jejich potomků spojeno s horšími stravovacími návyky a delší dobou strávenou u obrazovky. Děti rodičů s nižším socioekonomickým statutem se také méně často účastní organizovaných sportovních aktivit v rámci sportovních klubů (Fismen et al., 2021; Musić Milanović et al., 2021). Nelze však jednoznačně říci, že by u dětí rodičů s nižším socioekonomickým statutem celkově převažovaly nezdravé návyky, protože tyto děti méně často využívají jako způsob přepravy motorizovanou dopravu a tráví tak denně více času fyzickou aktivitou než děti z rodin s vyšším socioekonomickým statutem (Musić Milanović et al., 2021; Pouliou et al., 2015).

2.3.3. Psychologické faktory

Podíl psychologických faktorů na rozvoji nadváhy a obezity ilustruje například emoční přejídání jako reakce na stres a úzkostné či depresivní stavy (Demir Kösem et al., 2024; Muha et al., 2024). Děti a adolescenti s obezitou zároveň častěji trpí duševními onemocněními, jako jsou deprese a poruchy příjmu potravy (Galler et al., 2024). Obezita je také spojována s nízkým sebevědomím, negativním vnímáním sebe sama a šikanou ve školním prostředí (Abdelmalek et al., 2024; Moradi et al., 2021).

2.3.4. Genetické faktory

Ačkoliv je význam vnějšího prostředí pro rozvoj obezity důležitý, i tělesná stavba jedinců vystavených působení stejného prostředí se může lišit. Tento rozdíl je vysvětlován genetickou variabilitou ovlivňující individuální náchylnost k rozvoji obezity (Loos & Yeo, 2022). O genetické podmíněnosti obezity svědčí častý familiární výskyt onemocnění a značná heritabilita. Heritabilita udává, jak velká část proměnlivosti znaku je zapříčiněna genetickými faktory. Odhaduje se, že zhruba 40–70% variability znaků spojených s obezitou je geneticky determinováno (Allison et al., 1996; Stunkard et al., 1990). Geny mohou náchylnost k obezitě posilovat (obezigenní geny), ale také působit protektivně (leptogenní geny) (Hainer et al., 2008; Narjabadifam et al., 2021; Zillikens et al., 2017).

Vliv genetických faktorů se projevuje na hodnotě BMI (Narjabadifam et al., 2021), procentu tukové hmoty (Lu et al., 2016), distribuci tělesného tuku (Pulit et al., 2019; Rask-Andersen et al., 2019), procentu tukuprosté hmoty (Zillikens et al., 2017) a hladinách leptinu (Kilpeläinen et al., 2016) a leptinových receptorů (Sun et al., 2010). Kromě toho genetické faktory ovlivňují také behaviorální znaky, jako jsou chuťové preference a výběr potravin nebo tendence k přejídání (C. H. Llewellyn & Fildes, 2017; Robino et al., 2019; Vesnina et al., 2020).

Počet identifikovaných chromozomálních oblastí, které jsou asociovány s tělesnou hmotností, v současné době již přesáhl tisíce a stále přibývají další. I přes stále se zefektivňující přístupy výzkumu genetického pozadí obezity vysvětlují doposud popsané varianty genů pouze 5–6 % variability v hodnotách BMI (Trang & Grant, 2023).

3 Výzkum genetického pozadí obezity

Cílem genetických studií je definovat genetickou komponentu tohoto komplexního onemocnění, identifikovat rizikové alely v kandidátních genech, ověřit jejich patogenetickou roli, studovat jejich vzájemné působení a interakci genetického prostředí s vnějšími faktory. To je v případě multifaktoriálních onemocnění velmi obtížné. Genetické analýzy běžné obezity komplikuje řada faktorů, např. genetická heterogenita (k manifestaci téhož onemocnění může u různých jedinců přispívat rozdílné genetické pozadí), neúplná penetrance (přítomnost patologických alel se nemusí projevit manifestací choroby) nebo fenokopie (onemocnění se projeví i v nepřítomnosti sledované patologické alely). Další komplikací představuje také

neúplná znalost přesných fyziologických procesů uplatňujících se při rozvoji obezity (Sulc et al., 2020; Yang et al., 2022).

Možnost využití genetických přístupů ve výzkumu fyziologických a molekulárních mechanismů řízení tělesné hmotnosti naznačily již rané studie dvojčat, které odhalily výraznou genetickou komponentu ve fenotypových znacích obezity (Silventoinen et al., 2010; Stunkard et al., 1986). Význam role genetického pozadí ještě více zdůraznily studie adoptovaných dětí, které pozorovaly větší podobnost hodnot BMI mezi adoptovanými dětmi a jejich biologickými rodiči i biologickými sourozenci ve srovnání s adoptivními rodiči, s nimiž tyto děti sdílely stejné prostředí (Silventoinen et al., 2010). Genetická analýza komplexních onemocnění, mezi něž běžná obezita patří, může využívat mnoho různých metodických přístupů a strategií.

3.1. Vazebná analýza a celogenomové skeny

Vazebná analýza a celogenomové skeny (*Genome-Wide Linkage Scans*, GWLS) představovaly první systematický přístup, který rozšířil analýzu genetických asociací z omezených oblastí na celý genom. Vazebná analýza umožňuje identifikaci lokusů spojených s nemocí testováním kosegregace genetických markerů spojených s onemocněním v rámci rodin. GWLS identifikují chromozomální oblasti, které jsou pro daný fenotyp relevantní. V těchto oblastech se může nacházet pouze jeden, ale také více genů. Přestože bylo identifikováno více než 250 chromozomálních oblastí potenciálně asociovaných s obezitou, identifikace kauzálních genů nebyla příliš úspěšná. GWLS se ukázaly jako vhodný nástroj při identifikaci genů, které způsobují monogenní onemocnění, ale kvůli omezené statistické síle nejsou schopné odhalit geny s menšími nebo středně velkými účinky (Diels et al., 2020; Rankinen et al., 2006).

3.2. Asociační studie kandidátních genů obezity

Asociační studie kandidátních genů se zaměřují na geny, které jsou již známé nebo mají předpokládanou biologickou funkci, která by mohla souviset s rozvojem daného onemocnění. Počátky výzkumu genů uplatňujících se při polygenní obezitě jsou spjaté se studiem genů, které byly identifikovány pomocí animálních modelů či u osob s monogenní obezitou. Poslední dostupná publikace *Human Obesity Gene Map* z roku 2005 uvádí seznam 127 kandidátních genů, které jsou asociovány s obezitou či jejími fenotypovými projevy. Tyto kandidátní geny asociované s obezitou byly identifikovány na všech lidských chromozomech, s výjimkou

chromozomu Y. Do roku 2005 však byla pouze u 22 kandidátních genů asociace s obezitou podpořena výsledky alespoň pěti nezávislých studií (Rankinen et al., 2006).

3.3. Celogenomové asociační studie

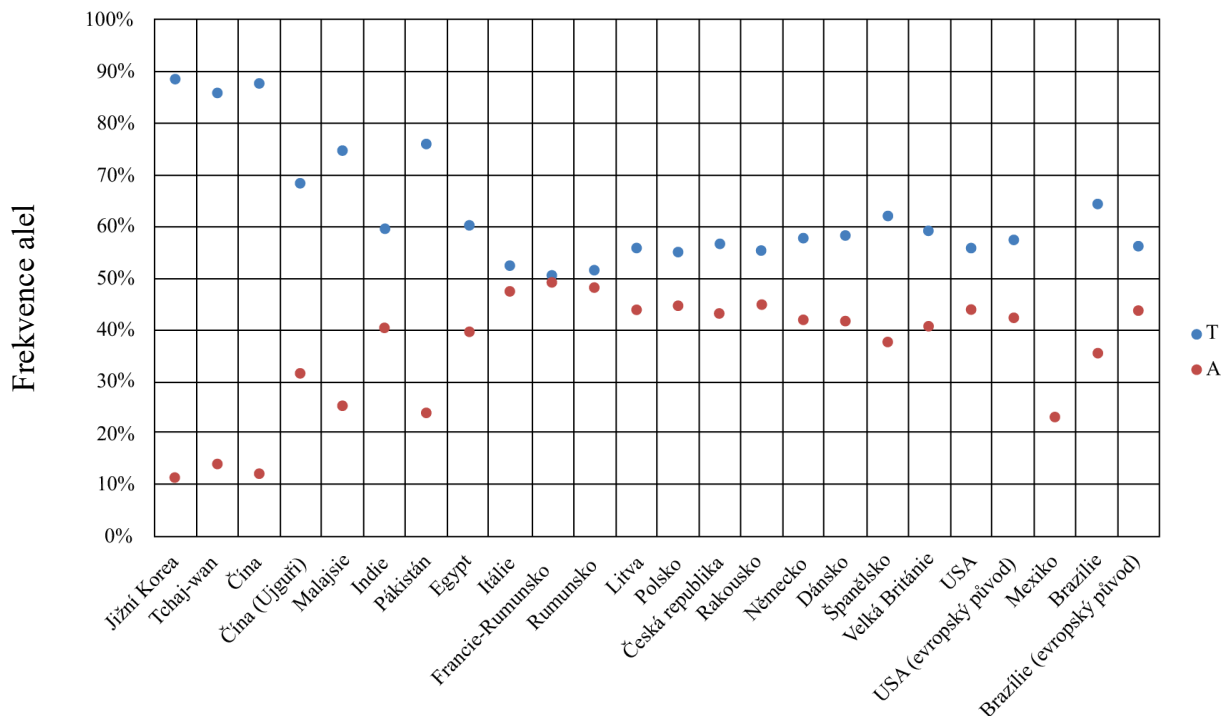
Významný milník, který skokově posunul výzkum genetického pozadí běžných forem obezity, nastal v roce 2007, kdy byly publikovány výsledky prvních celogenomových asociačních studií (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS). GWAS komplexních onemocnění jsou založeny na genotypizaci jednonukleotidových polymorfismů genů v rámci celého genomu a následné statistické analýze rozdílu ve frekvencích těchto variant v souboru nemocných a v souboru kontrol (Albuquerque et al., 2015).

Prvním popsáním polymorfismem identifikovaným pomocí GWAS s asociací k fenotypu obezity byl rs7566605 (G/C) v blízkosti genu *INSIG2* (z angl. insulin-induced gene 2). Jednoznačná asociace tohoto polymorfismu s obezitou však nebyla replikačními studii potvrzena (Herbert et al., 2006).

Proto je za první polymorfismus, u kterého bylo jednoznačně prokázáno spojení s obezitou, považován rs9939609 (T/A) nacházející se v prvním intronu genu *FTO* (fat-mass and obesity associated protein). Studie autorů Frayling et al. (2007) testovala korelaci mezi polymorfismy genomu a T2DM. Byla zjištěna silná asociace polymorfismu rs9939609 genu *FTO* s T2DM a zvýšeným BMI. Po adjustaci na BMI však asociace s T2DM nebyla zachována. Tento výsledek naznačil, že zvýšené riziko rozvoje T2DM tak pravděpodobně nesouvisí přímo s efektem polymorfismu, nýbrž se zvýšeným BMI. Nález asociace polymorfismu rs9939609 genu *FTO* se zvýšeným BMI byl potvrzen v replikační studii na kohortě jedinců evropského původu. Jako rizikový faktor pro vyšší hodnoty BMI byla označena přítomnost minoritní alely A, jejíž přítomnost byla u dospělých jedinců spojena s navýšením BMI přibližně o 0,36 kg/m². Zároveň byl zjištěn kumulativní efekt na hodnotu BMI při přítomnosti dvou alel A. Hmotnost jedinců s genotypem A/A byla v průměru o 3 kg vyšší než u jedinců bez přítomnosti rizikové alely (genotyp T/T). Polymorfismus rs9939609 genu *FTO* vysvětloval u této evropské kohorty přibližně 1 % variability v BMI (Frayling et al., 2007).

Nález asociace polymorfismu rs9939609 genu *FTO* s obezitou byl potvrzen mnoha dalšími pracemi a další replikační kohorty byly rozšířeny také o jedince mimoevropských etnik (Ben Halima et al., 2018; Nindrea & Thongwichian, 2024; T. Sharma & Badaruddoza, 2024).

V review autorů Baručija-Özçoban et al. (2018) byla na základě 32 studií, které se věnovaly SNP rs9939609 genu *FTO*, mapována frekvence rizikové alely A u celkem 24 populací. Nejvyšší frekvence minoritní alely A byla zaznamenána u populací evropského původu, konkrétně ve francouzsko-rumunské (i samostatné rumunské) a italské kohortě. Naopak nejnižší frekvence alely A pak byla zjištěna u asijských populací, konkrétně v kohortě z Jižní Koreje, Číny a Tchaj-wanu (Baručija-Özçoban et al., 2018). Frekvenční zastoupení alel T a A v jednotlivých populacích zobrazuje obrázek 5.



Obr. 5: Frekvenční zastoupení alel T a A polymorfismu rs9939609 genu *FTO* u studovaných populací. Převzato z Baručija-Özçoban et al. (2018).

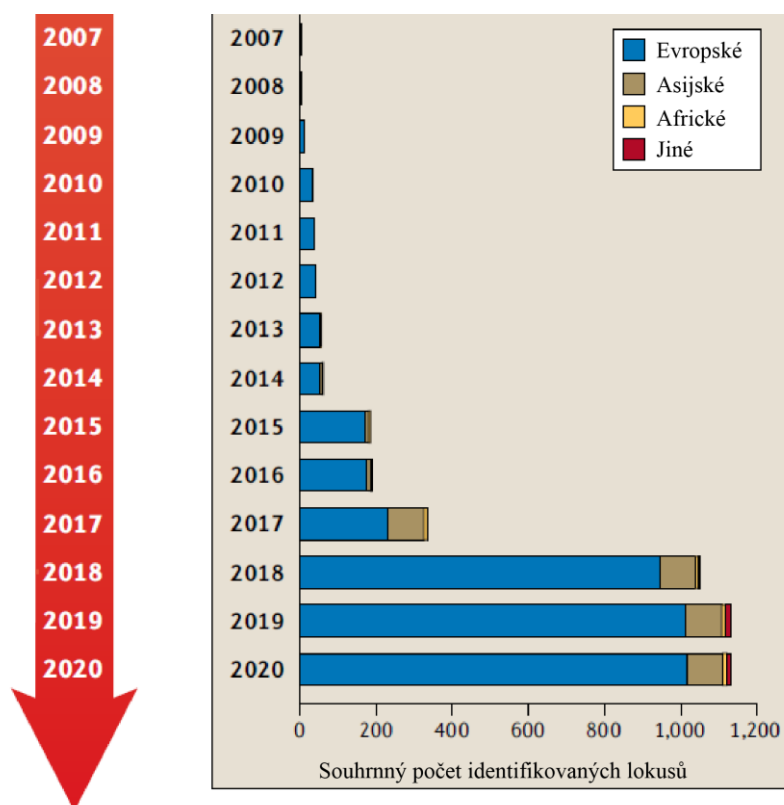
V průběhu let bylo objeveno několik dalších polymorfismů v genu *FTO* asociovaných s obezitou, a kromě vztahu k BMI byla nalezena také souvislost s dalšími znaky souvisejícími s obezitou (Doaei et al., 2019; Katus et al., 2020; Qureshi et al., 2017). Například v indické studii byla zjištěna asociace polymorfismu rs17817449 (T/G) genu *FTO* s vyššími hodnotami těchto parametrů: BMI, obvod pasu, WHR, WHtR, systolický tlak, diastolický tlak a hladina triacylglycerolů v séru (T. Sharma & Badaruddoza, 2024). Pákistánská studie pak našla asociaci polymorfismu rs3751812 (G/T) genu *FTO* s vyššími hodnotami BMI, nižšími hladinami HDL-cholesterolu a vyššími hladinami LDL-cholesterolu (Qureshi et al., 2017).

Obdobné výsledky byly zaznamenány také v asociačních studiích u dětí a adolescentů. Již v původní práci autorů Frayling et al. (2007) byla přítomnost minoritní alely A SNP rs9939609 genu *FTO* spojena se zvýšeným rizikem obezity ve věku 7, 8, 9, 10 a 11 let u dětí evropské kohorty. Přítomnost každé alely A byla v 7 letech asociována s navýšením BMI přibližně o 0,2 kg/m². Tento efekt byl zachován až do 11 let věku, kdy byla přítomnost rizikové alely A spojena s navýšením BMI přibližně o 0,4 kg/m² (Frayling et al., 2007).

Následné studie tento nálezný potvrzily u dalších etnických skupin a kohorty byly rozšířeny také o adolescenty (da Silva et al., 2018; Eghbali et al., 2024; Quan et al., 2015). Kromě polymorfismu rs9939609 genu *FTO* byly pomocí GWAS u dětí a adolescentů zjištěny asociace s obezitou také u dalších čtyř polymorfismů v tomto genu (rs1421085 (T/C), rs1861868 (C/T), rs1477196 (A/G) a rs17817449 (G/T)), což dále potvrdilo významnou asociaci genu *FTO* s obezitou jak u dospělých, tak u dětí a adolescentů (Eghbali et al., 2024).

Komplexní mechanismy rozvoje polygenní obezity vyplývající z interakce mezi vnějším prostředím, genetickou predispozicí a lidským chováním potvrzují i další výsledky nedávných studií. Ty ukazují, že vliv variant genu *FTO* na vznik obezity lze ovlivnit návyky zdravého životního stylu (da Silva et al., 2018). Například v tchajwanské studii byl zjištěn významný vztah mezi variantou rs1421085 (T/C) genu *FTO* a fyzickou aktivitou, který se projevoval na tělesné hmotnosti a BMI. U jedinců s minoritní alelou C byl pozorován větší nárůst v BMI než u jedinců s genotypem T/T v případě, že se pravidelně nevěnovali žádné fyzické aktivitě. Zajímavým zjištěním však bylo, že příznivý účinek pravidelné fyzické aktivity byl výraznější u jedinců s minoritní alelou C, u kterých ve srovnání s jedinci s genotypem T/T docházelo při pravidelné fyzické aktivitě k nižšímu nárůstu hodnot BMI (Hiraike et al., 2021).

Od roku 2007, kdy byla publikována první GWAS související s fenotypem obezity, bylo již identifikováno více než 1100 chromozomálních lokusů s potenciálním významem v náchylnosti k obezitě (Loos & Yeo, 2022). Časovou osu identifikace lokusů asociovaných s obezitou u různých etnik zobrazuje obrázek 6.



Obr. 6: Celkový počet identifikovaných lokusů asociovaných s polygenní obezitou u různých etnik. Upraveno podle Loos & Yeo (2022).

Každá další publikovaná GWAS rozšiřuje počet studovaných osob, čímž se také zvyšuje statistická síla pro identifikaci dalších lokusů – zejména vzácnějších lokusů nebo lokusů s nižšími účinky. Pro tyto účely vznikají rozsáhlé mezinárodní spolupráce, mezi něž patří např. konsorcium *Genetic Investigation for Anthropometric Traits* (GIANT). Výzkumníci konsorcia slučují datasety z dosud provedených GWAS, čímž vznikají kohorty se statisíčovými počty jedinců (Xia & Grant, 2013). Důležitou funkci plní také biobanky, tedy databáze DNA vznikající pro výzkumné účely (Shaw et al., 2014). Sloučením dat získaných GIANT a dat z britské biobanky byla vytvořena kohorta přibližně 700 tisíc jedinců, u kterých bylo identifikováno 751 nových lokusů s asociací k BMI (Yengo et al., 2018).

Přestože jsou GWAS schopny odhalit velké množství lokusů a kandidátních genů polygenní obezity, snahy o objasnění přesných fyziologických mechanismů působení těchto genů zatím nebyly příliš úspěšné. Analýzou exprese 106 genů nacházejících se v blízkosti polymorfismů, které byly pomocí GWAS identifikovány jako polymorfismy zvyšující náchylnost k obezitě, bylo zjištěno, že tyto geny jsou ve velkém množství exprimovány v různých oblastech mozku. Nejvyšší exprese byla pozorována v insule a substantia nigra, což jsou oblasti spojené se systémem odměny a rozvojem závislosti (Ndiaye et al., 2020).

Tato zjištění nastínila odlišnosti v patofyziologii monogenní a polygenní obezity, protože většina genů monogenní obezity je exprimována převážně v hypothalamu. Produkty genů monogenní obezity mají významnou roli v leptin-melanokortinové dráze, která zajišťuje energetickou homeostázu organismu. Mutace v genech monogenní obezity způsobují narušení této dráhy a tím i narušení energetické rovnováhy spojené s výraznou hyperfágií (Dosda et al., 2024). Zapojení insuly a substantia nigra do mechanismů řízení tělesné hmotnosti v případě polygenní obezity naznačuje komplexní vztah mezi jídelním chováním a faktory vnějšího prostředí (Saeed et al., 2024).

Tomu by odpovídaly nálezy asociačních studií, které u nositelů popsáných variant v genu *FTO* zaznamenaly vyšší celkový příjem kalorií (Speakman, 2015), vyšší frekvenci konzumace potravy (McCaffery et al., 2012) nebo preferenci konzumace potravin s vyšším obsahem cukru a tuku (Al-Jawadi et al., 2021; Park et al., 2013; Poosri et al., 2024).

U genu *FTO* byl popsán také potenciální mechanismus vlivu polymorfismů na regulaci energetické rovnováhy. Výzkumy prokázaly, že intronové polymorfismy genu *FTO* mohou přímo interagovat s promotorovou oblastí v blízkosti genu *IRX3* (iroquois homeobox 3) a tím regulovat jeho funkci. Proteinový produkt genu *IRX3* se v ontogenezi uplatňuje při vývoji nervového systému a je čteně exprimován v mozku, proto může mít potenciálně roli v mechanismech regulace energetické rovnováhy (Smemo et al., 2014).

3.4. Celogenomové a celoexomové sekvenování

I přes výrazný posun ve výzkumu genetického pozadí obezity, který přinesly GWAS, zůstává stále významná část genetického základu obezity nevysvětlena (Trang & Grant, 2023). Několik genetických studií obezity i některých dalších komplexních fenotypů ukázalo, že významnou roli v rozvoji komplexního fenotypu mohou mít také vzácné varianty genů (Akbari et al., 2021; Majithia et al., 2014), které však GWAS neodhalí. Potenciál pro další výzkum nabízejí moderní sekvenační metody, jako je celogenomové a celoexomové sekvenování za pomoci metod sekvenování nové generace (*Next Generation Sequencing*, NGS). Využití NGS umožňuje současnou identifikaci běžných i vzácných variant genů. Tento přístup se již dříve osvědčil v identifikaci mutací v genech způsobujících monogenní onemocnění (Boycott et al., 2013) a v současnosti je stále častěji využíván také ve výzkumu komplexních onemocnění (Nordang et al., 2017). Je pravděpodobné, že v nadcházejících letech povedou rozsáhlé populační studie

využívající NGS k identifikaci dalších běžných i vzácných variant genů s významem v náchylnosti k obezitě (Novelli et al., 2023).

Přístupů NGS ve výzkumu genetických příčin obezity bylo využito v norské studii autorů Nordang et al. (2017), kteří u probandů s morbidní obezitou a probandů normostenických provedli sekvenaci exonů genů, jejichž mutace jsou příčinou monogenní obezity – *LEP*, *LEPR*, *MC4R*, *PCSK1* a *POMC*. Kromě variant, které způsobují monogenní obezitu, byly v těchto genech identifikovány také jiné vzácné varianty, které monogenní obezitu nezpůsobují. Identifikované vzácné varianty se v porovnání s kontrolami signifikantně častěji vyskytovaly u morbidně obézních probandů. Tento náález naznačuje souvislost mezi vzácnými variantami v těchto pěti genech a výskytem morbidní obezity (Nordang et al., 2017).

Značně rozsáhlejší studii, využívající taktéž metodu celoexomového sekvenování, provedli autoři Akbari et al. (2021). V této studii bylo díky sekvenaci exomů 640 tisíc osob objeveno 16 genů, jejichž vzácné varianty jsou asociovány s BMI. Kromě toho studie potvrdila význam variant genů *LEP*, *POMC*, *PCSK1* a *MC4R* také v rozvoji polygenní obezity. Přítomnost heterozygotních variant polymorfismů v těchto genech, které způsobují ztrátu funkce proteinu, byla spojena s vyšším BMI. Vzácné varianty v genu *PCSK1* způsobující zkrácení proteinu pak byly u heterozygotních nositelů spojeny s více než dvojnásobně vyšší pravděpodobností výskytu obezity než v případě jedinců bez těchto variant. Dalším důležitým přínosem celoexomového sekvenování v této studii bylo zjištění, že přítomnost více než 2 milionů běžných variant v genech či lokusech asociovaných s BMI se aditivním způsobem podílí na uplatnění efektu vzácných variant, a tím i na výsledném fenotypovém projevu (Akbari et al., 2021). Tato zjištění dále zdůraznila roli komplexních interakcí genů uplatňujících se v etiopatogenezi polygenní obezity.

3.5. Animální studie

S výzkumem genetického pozadí obezity jsou významně spjaty taktéž studie prováděné na zvířecích modelech. První poznatky o genech spojených s regulací hmotnosti byly získány právě studiem animálních modelů, zejména myších linií *obese* a *diabetes*, které se vyznačovaly spontánním vznikem těžké obezity a hyperfágie (Coleman, 1973, 1978). Zásadní milník výzkumu představoval objev *ob* genu kódujícího leptin u myší linie *obese* v roce 1994. U myší s mutací v *ob* genu (*ob/ob* genotyp) byla pozorována deficiencie leptinu spojená s těžkou formou

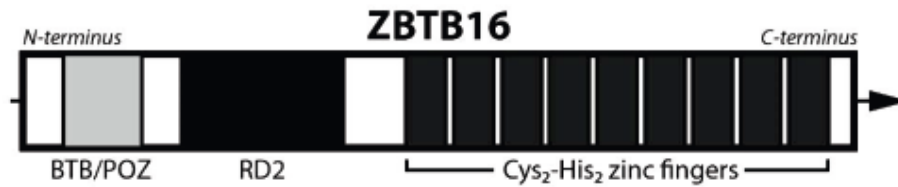
obezity (Zhang et al., 1994). Následoval objev genu pro leptinový receptor u myši linie *diabetes* (db) (Chen et al., 1996), což podpořilo teorie o roli leptinu v regulaci tělesné hmotnosti a později vedlo k objasnění jeho významu v leptin-melanokortinové dráze.

Poznatky získané studii animálních modelů umožnily výběr kandidátních homologních genů pro studium monogenní obezity u lidí. Již roku 1997 byly popsány první případy osob s vrozenou deficiencí leptinu (Montague et al., 1997) a záhy poté také případ ženy s mutací v *LEPR* (Clément et al., 1998). Oba nálezy spojoval fakt, že probandi pocházeli z rodin s historií příbuzenských sňatků, což mělo za následek homozygotní výskyt těchto jinak velice vzácných mutací. Následovaly detekce mutací v genech kódujících komponenty leptin-melanokortinové dráhy (*POMC*, *MC4R*, *PCSK1*) (Jackson et al., 1997; Krude et al., 1998; Vaisse et al., 1998). Pro nositele všech těchto mutací byl charakteristický výskyt těžké obezity již od raného dětství a výrazná hyperfagie, tedy znaky shodné s myšimi modely, z čehož byla usuzována přímá kauzální souvislost mezi genetickými mutacemi v těchto genech a rozvojem těžkých forem obezity.

Studie animálních modelů rovněž přispěly k identifikaci genů spojených s komplexními onemocněními, jako je metabolický syndrom. Jedním z těchto genů je *ZBTB16* (zinc finger and BTB domain containing 16) (Šeda et al., 2017), který byl studován v této diplomové práci.

3.6. ZBTB16 (zinc finger and BTB domain containing 16)

Gen *ZBTB16* byl u lidí poprvé popsán v roce 1988 v souvislosti s akutní myeloidní leukémií (odtud taktéž používaný název promyelocytic leukemia zinc finger, *PLZF*) (Grignani et al., 1998). *ZBTB16* kóduje protein, který funguje jako transkripční faktor (Suliman et al., 2012). Struktura proteinu je u savců dobře zakonzervována. Na C-konci se nachází devět zinkových prstů typu Cys₂-His₂, které umožňují vazbu na specifické sekvence DNA. Na N-konci se nachází komplex BTB/POZ uplatňující se při formaci represorových komplexů. Mezi nimi je represorová doména RD2 (Li et al., 1997; Suliman et al., 2012). Strukturu proteinu genu *ZBTB16* zobrazuje obrázek 7.



Obr. 7: Struktura proteinu genu ZBTB16.

BTB/POZ – bric a brac-tramtrack-broad complex/poxvirus and zinc-finger;

RD2 – repressor domain;

Cys₂-His₂ zinc fingers – zinkové prsty;

N-terminus – N-konec;

C-terminus – C-konec;

Převzato z Šeda et al. (2017).

ZBTB16 patří do rodiny proteinů, které prostřednictvím modifikací histonů a metylací DNA navozují epigenetické změny vedoucí k regulaci aktivity chromatinu (Puszyk et al., 2013). Protože je tento transkripční faktor zásadní pro mnoho biologických procesů (např. buněčný cyklus, apoptóza), podléhá posttranslačním modifikacím, které modulují jeho aktivitu (Suliman et al., 2012). Může být fosforylován (Costoya et al., 2008), acetylován (Guidez et al., 2005) nebo může podléhat ubikvitinaci, kdy je na protein vázán ubikvitin označující jej pro budoucí degradaci (Sobieszczyk et al., 2010) či sumoylaci, kdy na sebe váže signální protein SUMO-1, který se uplatňuje v procesech regulace transkripce (Kang et al., 2003).

Poznatky získané studii animálních modelů poukazují na významnou roli ZBTB16 v procesech podílejících se na patogenezi parametrů metabolického syndromu, jako jsou obezita, hypertenze a dyslipidémie (Šeda et al., 2017). Studie myších modelů s regulovanou expresí *Zbtb16* odhalily roli tohoto genu v adipogenezi (Mikkelsen et al., 2010), regulaci lipidového metabolismu (Chen et al., 2014), inzulínové senzitivě (Liška et al., 2017) a v rozvoji kardiomyopatie spojené s hypertenzí (Scheffe et al., 2006).

Vztah *ZBTB16* a parametrů metabolického syndromu byl ověřen také studií provedenou na dospělých lidech. Studie autorů Bendlová et al. (2017) sledovala asociaci devíti polymorfismů v genu *ZBTB16* s antropometrickými parametry a s hladinami lipidů v krevním séru. U mužů byla přítomnost minoritních alel polymorfismů rs567057, rs661223, rs675044 a rs686989 genu *ZBTB16* spojena se signifikantně vyšším BMI, WHR, WHtR, indexem tělesné

adipozity, obvodem pasu a obvodem břicha a dále s vyšším celkovým cholesterolem a LDL-cholesterolem. V případě žen byl signifikantní vliv na výše popsané parametry zaznamenán pouze u polymorfismu rs686989 (Bendlová et al., 2017).

Na základě výsledků studie autorů Bendlová et al. (2017) byl polymorfismus rs686989 v genu *ZBTB16* vybrán pro otestování jeho vlivu na vybrané antropometrické a biochemické parametry v kohortě českých adolescentů v rámci této diplomové práce.

4 Hypotézy a cíle

Obezita je širokou veřejností, ale také mnohými odborníky, považována za onemocnění významně související především s životním stylem. Přestože význam genetických faktorů bývá často podceňován, je neméně důležitým a přinejmenším srovnatelným s významem životního stylu.

Pokroky v oblasti molekulární genetiky přinesly důležité poznatky pro studium genetických příčin obezity. Postupně došlo k identifikaci některých genů, jejichž mutace jsou zodpovědné za vznik monogenních forem obezity. Monogenní formy obezity jsou však u lidí velmi vzácné a většina případů obezity má spíše oligogenní či polygenní charakter. To znamená, že obezita vzniká v důsledku vzájemné interakce prostředí s geny. Prostor ke vzniku obezity přispívá nebo naopak jejímu rozvoji brání.

Úpravou životního stylu a léčbou obezity lze působení prostředí významně modifikovat, a zabránit tak klinické manifestaci genů podmiňujících náchylnost k obezitě. Dosud bylo odhaleno na 1100 chromozomálních oblastí souvisejících s fenotypem obezity, rozvojem obezity nebo schopností redukovat tělesný tuk v průběhu redukčního režimu (Loos & Yeo, 2022). Tyto poznatky by mohly být v budoucnosti aplikovány při diagnostice obezity, která by nemusela být založena pouze na fenotypových znacích, ale také na genetických charakteristikách jedinců.

Diplomová práce zahrnuje dvě samostatné studie, které reprezentují možné přístupy ve výzkumu genetického pozadí obezity. Průřezová studie je typem asociační studie a byla zaměřena na hodnocení sportovní aktivity na tělesné složení a metabolické zdraví u dětí a adolescentů. Hodnotila také vliv polymorfismu rs686989 v genu *ZBTB16* na sledované antropometrické a biochemické parametry související s nadváhou a obezitou. Longitudinální studie byla zaměřena na hledání nových kandidátních variant pro nadměrnou hmotnost s využitím technik masivního paralelního sekvenování exomu u osob se zvýšeným rizikem obezity.

Cíli předkládané práce jsou:

Průřezová studie

- 1) Zhodnotit vliv pohybové aktivity na tělesné složení a metabolické zdraví jedinců ze souboru získaného v rámci projektu COPAT.
- 2) Provést asociační analýzu vybraného polymorfismu rs686989 v genu *ZBTB16* se sledovanými antropometrickými a biochemickými parametry.

Longitudinální studie

- 1) Na základě sekvenace exomu souboru pacientů s podezřením na monogenní obezitu vytipovat běžné varianty v kandidátních genech pro monogenní obezitu.
- 2) Zjistit frekvence vytipovaných variant u osob se zvýšeným rizikem obezity.

5 Soubor – průřezová studie

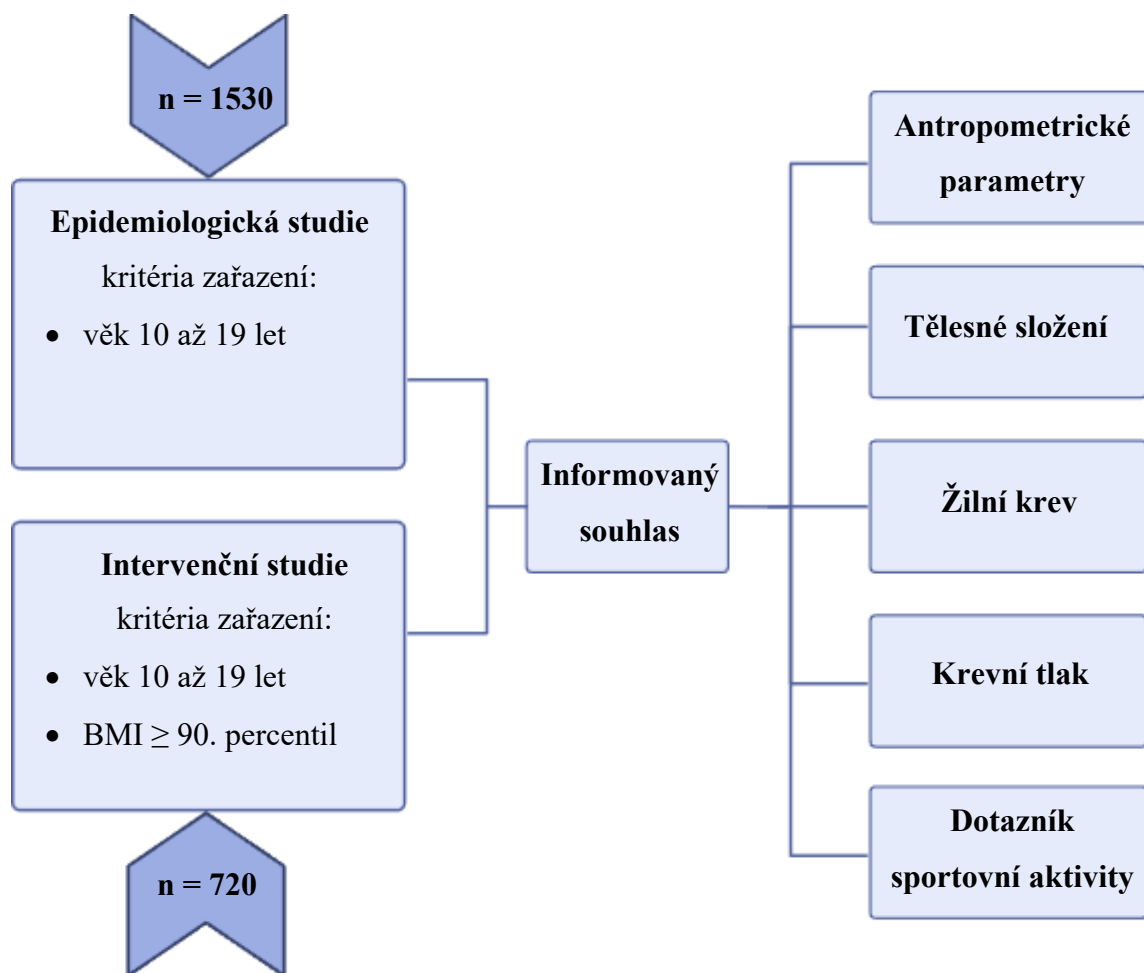
Diplomová práce vychází z dat získaných od dětí a adolescentů, kteří se v letech 2009–2011 zapojili do projektu *Childhood Obesity Prevalence and Treatment* (COPAT) organizovaného Endokrinologickým ústavem v Praze. Cílem projektu bylo monitorovat prevalenci nadváhy, obezity a metabolického syndromu v adolescentním věku v České republice a dále studovat rizikové faktory spojené s rozvojem nadměrné tělesné hmotnosti. Projekt sestával z epidemiologické a intervenční studie.

Probandi sledovaní v rámci epidemiologické studie představovali reprezentativní vzorek populace českých adolescentů ve věku od 10 do 19 let. Sběr dat probíhal v předem vytipovaných pediatrických ordinacích po celé České republice a probandi byli pediatry do studie vybíráni náhodně pouze na základě odpovídajícího věku. V této části byla získána data celkem od 1530 probandů.

V rámci intervenční studie byl sledován průběh a úspěšnost redukční léčby adolescentů podstupujících lázeňský ozdravný pobyt. Do studie byli zařazeni jedinci požadovaného věku, jejichž BMI se pohybovalo nad 90. percentilem dle věku a pohlaví. Do intervenční části studie se zapojilo 720 probandů.

Celkem byla získána data 2250 probandů, avšak pro účely genetické analýzy bylo nutné v souboru ponechat pouze nepříbuzné jedince. Tímto krokem bylo odstraněno 26 osob. Dalších 277 osob muselo být ze souboru odstraněno pro nekompletní, chybějící či nesmyslně vyplněný dotazník sportovních aktivit. Konečný soubor pro genetickou studii tvořilo 1947 nepříbuzných jedinců s kompletními dotazníky sportovních aktivit.

Studii COPAT schválila Etická komise Endokrinologického ústavu v Praze a vyšetření dětí a adolescentů proběhlo vždy po seznámení zákonných zástupců s protokolem studie a po jejich podpisu informovaného souhlasu se studií. Schéma organizace projektu COPAT znázorňuje obrázek 8.



Obrázek 8: Schéma organizace projektu COPAT

6 Metody – průřezová studie

6.1. Antropometrická část a klinická část

Antropometrické a klinické vyšetření probíhalo v ordinacích praktických lékařů pro děti a dorost a v lázeňských zařízeních. Byly měřeny a vypočítány následující parametry:

- Tělesná výška – měřená antropometrem s přesností na 0,1 cm.
- Tělesná hmotnost – měřená na nášlapné digitální bioimpedanční váze (TANITA BC-480; Tanita Corporation, Tokyo, Japan) s přesností na 0,1 kg.
- Obvod pasu – měřený v polovině vzdálenosti mezi spodním okrajem dolního žebra a kyčelním hřebenem (crista iliaca) v horizontální rovině, měřeno pásovou mírou s přesností na 0,1 cm.
- BMI – index vypočítaný podle vzorce:

BMI = hmotnost (kg) / tělesná výška (m²)

- WHtR – index vypočítaný podle vzorce:

WHtR = obvod pasu (cm) / tělesná výška (m)

- Procento tělesného tuku a tukuprosté hmoty – měřené bioimpedanční metodou (TANITA BC-480; Tanita Corporation, Tokyo, Japan).
- Krevní tlak systolický a diastolický – měření v klidu, v sedě, pomocí digitálního tlakoměru.

6.2. Biochemická část

Ze žilní krve odebrané ráno nalačno byly stanoveny a vypočítány následující biochemické parametry glukózového a lipidového metabolismu:

- Parametry metabolismu glukózy – glykémie měřena enzymatickou referenční metodou s hexokinázou, inzulín stanoven pomocí ECLIA (Cobas 6000, Roche Diagnostics).
- Pro posouzení periferní inzulínové senzitivity byl vypočten model homeostázy inzulínové rezistence HOMA-R a pro inzulínovou sekreci byl vypočten model homeostázy funkce beta buněk HOMA-F:

$$\text{HOMA-R} = \frac{\text{glukóza (mmol/l)} \times \text{inzulín (mmol/l)}}{22,5}$$

$$\text{HOMA-F} = \frac{\text{inzulín (mmol/l)} \times 20}{\text{glukóza} - 3,5} \%$$

- Lipidový profil byl hodnocen pomocí celkového cholesterolu enzymatickým kolorimetrickým testem, lipoproteinu s vysokou hustotou (HDL), lipoproteinu s nízkou hustotou (LDL) homogenním enzymatickým kolorimetrickým testem a koncentrace triacylglycerolů enzymatickým kolorimetrickým testem (Cobas 6000, Roche Diagnostics).

6.3. Dotazníková část – sportovní aktivita

Zákonní zástupci probandů obdrželi dotazníky zjišťující osobní a rodinnou anamnézu probandů a stravovací a pohybové návyky. Pro účely diplomové práce byla vyhodnocena pouze část dotazníku věnovaná sportovní aktivitě.

Sportovní aktivita probandů ve studii COPAT byla hodnocena na základě dotazů na 21 konkrétních možností sportovních aktivit a dále na frekvenci těchto aktivit během školního týdne, během víkendu a v jednotlivých ročních obdobích. Nejednalo se o standardizovaný dotazník, proto bylo nutné vytvořit systém hodnocení sportovní aktivity. Před statistickou analýzou dat byli ze studie vyřazeni jedinci s nekompletně vyplněným nebo úplně chybějícím dotazníkem. Po tomto kroku zůstalo z původního souboru 2250 probandů 1947 jedinců s kompletními dotazníky.

K jednotlivým sportovním aktivitám bylo možné přiřadit číslo od 1 do 6 podle toho, kolik času týdně se dítě v každém ročním období věnuje konkrétní aktivitě. Číslo 1 představuje nulovou aktivitu, číslo 2 méně než 1,5 hodiny týdně, číslo 3 představuje 1,5 až 3 hodiny týdně, číslo 4 představuje 4 až 6 hodin týdně, číslo 5 představuje 7 až 9 hodin týdně a číslo 6 představuje sportovní aktivitu více než 10 hodin týdně.

Ze součtu hodnot pro jednotlivá roční období byla vypočítána průměrná roční hodnota skóre týdenní sportovní aktivity, čímž byl eliminován vliv sezónních variací na následnou analýzu. U těchto hodnot byla provedena tzv. standardizace rozpětím doporučená při analýze dat, která nemají normální rozdělení nebo obsahují odlehlé hodnoty. Standardizací byla data převedena do intervalu od 1,0 do 5,0 podle následujícího vzorce:

$$\text{Standardizovaná hodnota} = 1 + 4 \times \frac{\text{Původní hodnota} - \text{minimální hodnota souboru}}{\text{Maximální hodnota souboru} - \text{minimální hodnota souboru}}$$

Získané standardizované hodnoty byly následně rozděleny do kvartilů, čímž byly vytvořeny 4 kategorie, které byly využity pro finální asociační analýzu s vybranými antropometrickými a biochemickými parametry. Mezní hodnoty skóre pro jednotlivé kategorie uvádí tabulka 2.

Tab. 2: Mezní hodnoty skóre sportovní aktivity pro jednotlivé kategorie

Kategorie	Skóre – chlapci	Skóre – dívky
1	< 2,18	< 2,16
2	≥ 2,18 a < 2,75	≥ 2,16 a < 2,66
3	≥ 2,75 a < 3,37	≥ 2,66 a < 3,29
4	≥ 3,37	≥ 3,29

6.4. Genotypizace vybraného polymorfismu v genu *ZBTB16*

Pro asociační analýzu vlivu polymorfismu v genu *ZBTB16* na vybrané antropometrické a biochemické parametry byl na základě literatury vytipován polymorfismus rs686989 v genu *ZBTB16* (Bendlová et al., 2017).

Polymorfismus rs686989 v genu *ZBTB16* byl stanoven metodou tzv. Endpoint genotypizace s využitím TaqMan Genotyping Assays (Applied Biosystems, USA) na přístrojích LightCycler 480 (Roche, USA) a Biomark (Fluidigm, USA). Endpoint genotypizace je metoda, která se používá k určení genotypu vzorku na základě měření výsledné fluorescence po proběhnutí PCR reakce. Fluorescenční sondy jsou navrženy tak, aby se vázaly na alely cílových polymorfismů a v případě, že sonda hybridizuje s odpovídající sekvencí DNA, dochází k emitaci fluorescenčního záření a degradaci sondy. Genotyp vzorku je určen výslednou analýzou fluorescence každého vzorku.

6.5. Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí programů NCSS2019 (LLC, Kaysville, Utah, USA) a Statgraphics Centurion v. XVIII (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, Virginia, USA).

Hodnocené antropometrické a biochemické parametry nevykazovaly normální rozdělení, a proto byly před statistickou analýzou do normálního rozdělení upraveny mocninovou transformací. Poté byla pomocí obecného lineárního modelu (GLS) provedena analýza rozptylu (ANOVA), která testovala, zda se střední hodnoty sledovaného znaku (závislé proměnné, např. SDS BMI) liší mezi kategoriemi skóre sportovní aktivity (nezávislé proměnné). V případě proměnných, které závisely na věku, byla použita analýza kovariance (ANCOVA), která kromě hlavní nezávislé proměnné (skóre pohybové aktivity) zahrnovala také věk jako kovariátu. Tento postup omezil vliv věku na závislou proměnnou.

Frekvence genotypů a alel mezi sledovanými skupinami byly porovnány pomocí Chí kvadrát testu. Stejným testem byla otestována i Hardy-Weinbergova rovnováha. Ta obecně vypovídá

o frekvenci alel v panmiktické (jedinci se v populaci rozmnožují náhodně) a dostatečně velké populaci. V diplomové práci byla Hardy-Weinbergova rovnováha využita jako kontrola vhodné a náhodně zvoleného souboru a jako kontrola správnosti metodiky stanovení polymorfismu.

K odhadu míry závislosti byl využit poměr šancí pro dvě různé nezávislé proměnné (*odds ratio*, OR). Šance zde vyjadřuje pravděpodobnost výskytu jevu vůči jeho nevýskytu. Jedná se o statistický test využívaný ve studiích s case-control designem, kde je určena míra rizika studovaného faktoru na manifestaci onemocnění. OR představuje podíl šance, že se onemocnění vyskytne za určité podmínky, k šanci, že se onemocnění vyskytne, i když podmínka neplatí. Čím je OR vyšší, tím je asociace rizikového faktoru s onemocněním silnější. Pokud je OR nižší než 1, je zkoumaný faktor vůči onemocnění naopak protektivní. Pokud neexistuje žádný vztah mezi onemocněním a rizikovým faktorem, pak je OR roven 1.

K vyhodnocení poměru šancí byl využit program SNPstats (dostupný na: <https://www.snpstats.net/start.htm?>). Program v rámci analýzy testuje různé genetické modely (dominantní, recesivní, kodominantní) pro nalezení způsobu, jak daný polymorfismus ovlivňuje sledovaný fenotyp. Kodominantní model hodnotí efekty všech tří genotypů na fenotyp samostatně. Rozeznává tedy homozygota pro majoritní alelu, heterozygota a homozygota pro minoritní alelu. Dominantní model předpokládá, že se na výsledném fenotypu projeví přítomnost minoritní alely v heterozygotním i homozygotním stavu stejně. Recesivní model předpokládá, že genotyp působí na fenotyp pouze v přítomnosti dvou kopií minoritní alely. Nejvíce vyhovující model má nejnižší hodnotu Akaikova informačního kritéria (AIC).

7 Výsledky – průřezová studie

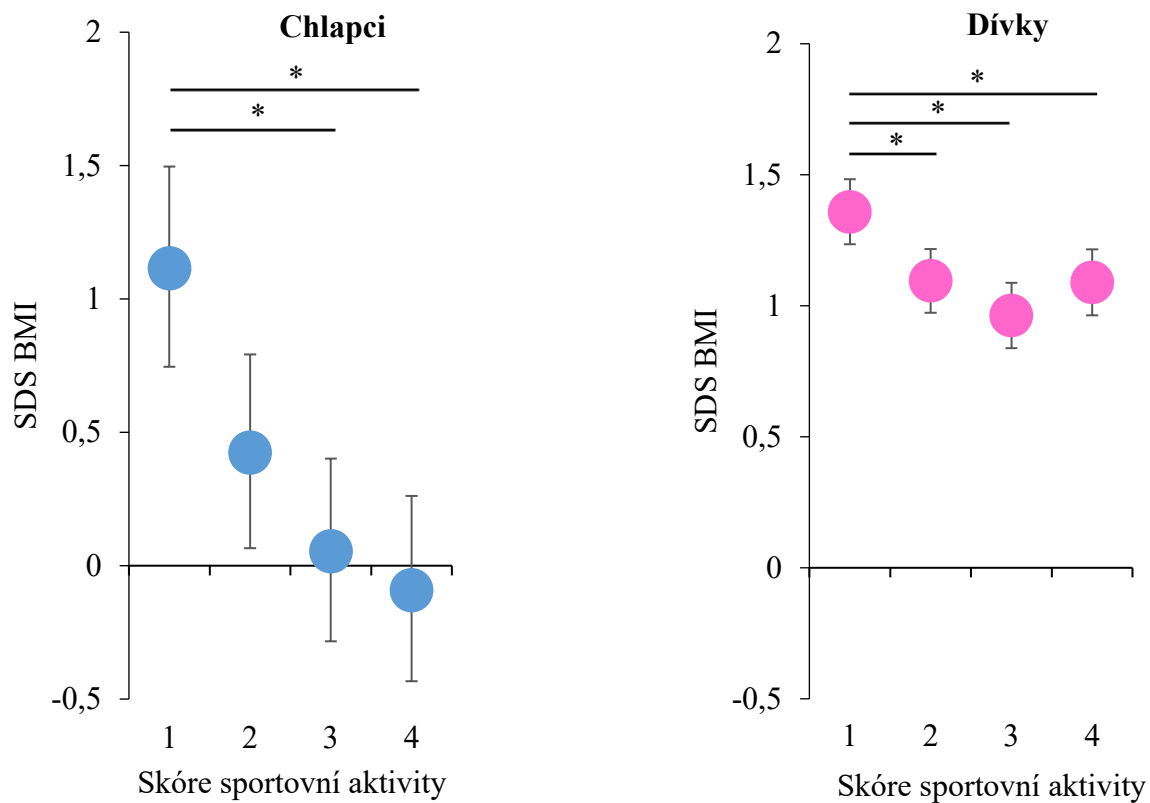
Rozdíl mezi sledovanými antropometrickými a biochemickými parametry mezi chlapci a dívkami prezentuje tabulka 3. Na základě těchto výsledků byli chlapci a dívky hodnoceni zvlášť.

Tab. 3: Antropometrická a biochemická charakteristika chlapců a dívek studovaného souboru

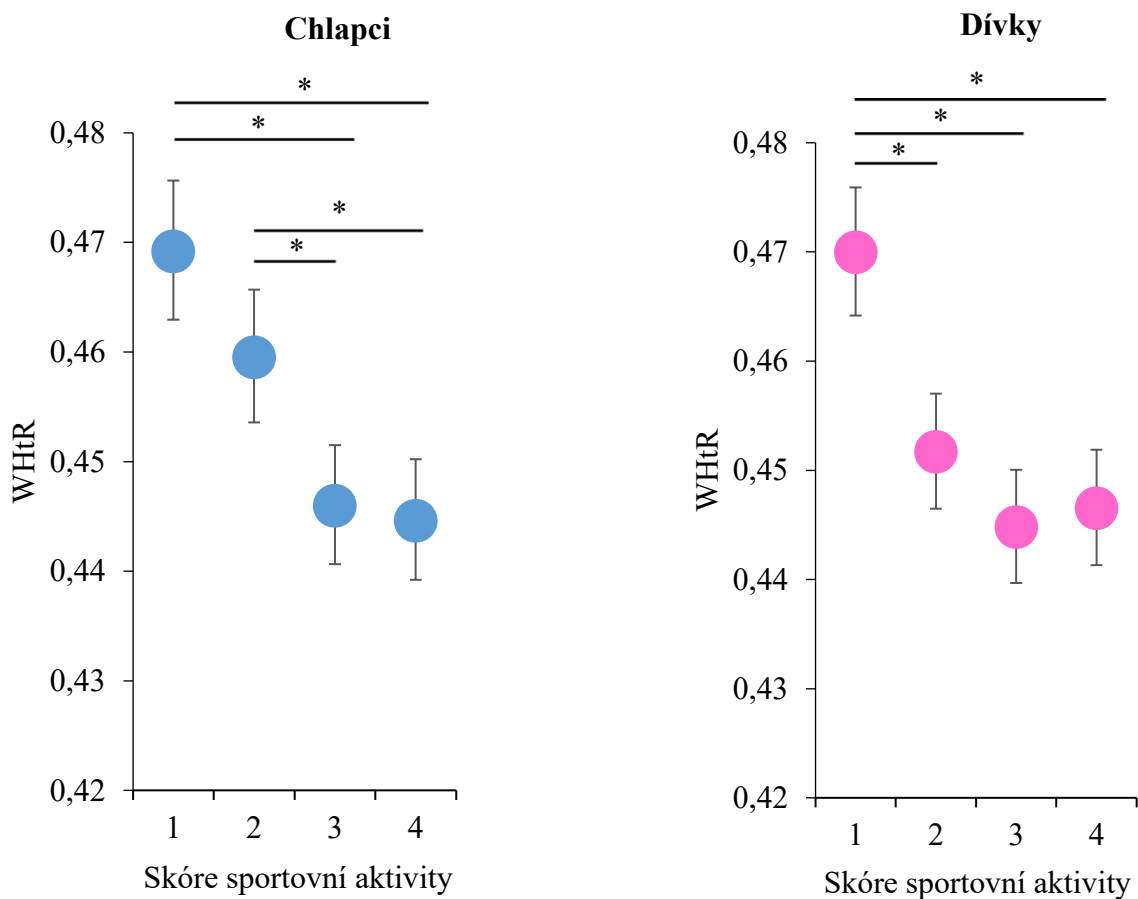
Charakteristika souboru	DÍVKY	CHLAPCI	Kruskal-Wallis test p-value
	Medián (kvartily)	Medián (kvartily)	
Počet	1055	892	
Základní antropometrické parametry			
Věk (roky)	15,6 (15,6, 17,2)	15,6 (14,3, 16,8)	0,316
SDS tělesné výšky	0,02 (-0,645, 0,485)	0,1 (-0,57, 0,823)	0,016
SDS tělesné hmotnosti	1,14 (-0,445, 0,975)	0,975 (-0,01, 2,34)	0,835
SDS obvodu pasu	1,19 (-0,4, 1,1)	0,95 (-0,01, 2,09)	<0,001
Tělesné složení a indexy			
SDS BMI	1,19 (-0,525, 0,96)	1,07 (-0,0425, 2,35)	0,525
WHtR	0,448 (0,397, 0,445)	0,446 (0,408, 0,528)	0,243
Procento celkového tělesného tuku	28,9 (21,1, 29,3)	18,7 (14,4, 27,9)	<0,001
Procento tukuprosté hmoty	71,2 (70,8, 78,9)	81,3 (72,2, 85,6)	<0,001
Krevní tlak			
Systolický krevní tlak (mmHg)	115 (109, 125)	125 (116, 134)	<0,001
Diastolický krevní tlak (mmHg)	77 (72, 86)	78 (72, 84)	0,018
Glukózový metabolismus			
Glykémie (mmol/l)	4,82 (4,42, 4,92)	5,07 (4,81, 5,32)	<0,001
Inzulín (mmol/l)	11,52 (7,29, 11,8)	10,5 (7,5, 15,6)	0,003
HOMA-R	2,45 (1,47, 2,4)	2,34 (1,67, 3,55)	0,361
HOMA-F (%)	180 (120, 229)	138 (99,3, 201)	<0,001
Lipidový metabolismus			
Celkový cholesterol (mmol/l)	4,28 (3,87, 4,95)	3,96 (3,49, 4,48)	<0,001
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,41 (1,44, 1,99)	1,27 (1,08, 1,46)	<0,001
Triacylglyceroly (mmol/l)	0,91 (0,69, 1,21)	0,87 (0,64, 1,2)	0,013
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,33 (2,13, 2,93)	2,18 (1,8, 2,65)	<0,001
Skóre sportovní aktivity			
Skóre	2,66 (2,21, 3,16)	2,75 (2,18, 3,37)	0,084

BMI – Body mass index, HDL – vysokodenzitní lipoprotein, HOMA-F – homeostatický model funkce beta buněk pankreatu, HOMA-R – homeostatický model inzulínové rezistence, LDL – nízkodenzitní lipoprotein, SDS – skóre směrodatné odchylky, WHtR – poměr obvodu pasu k výšce

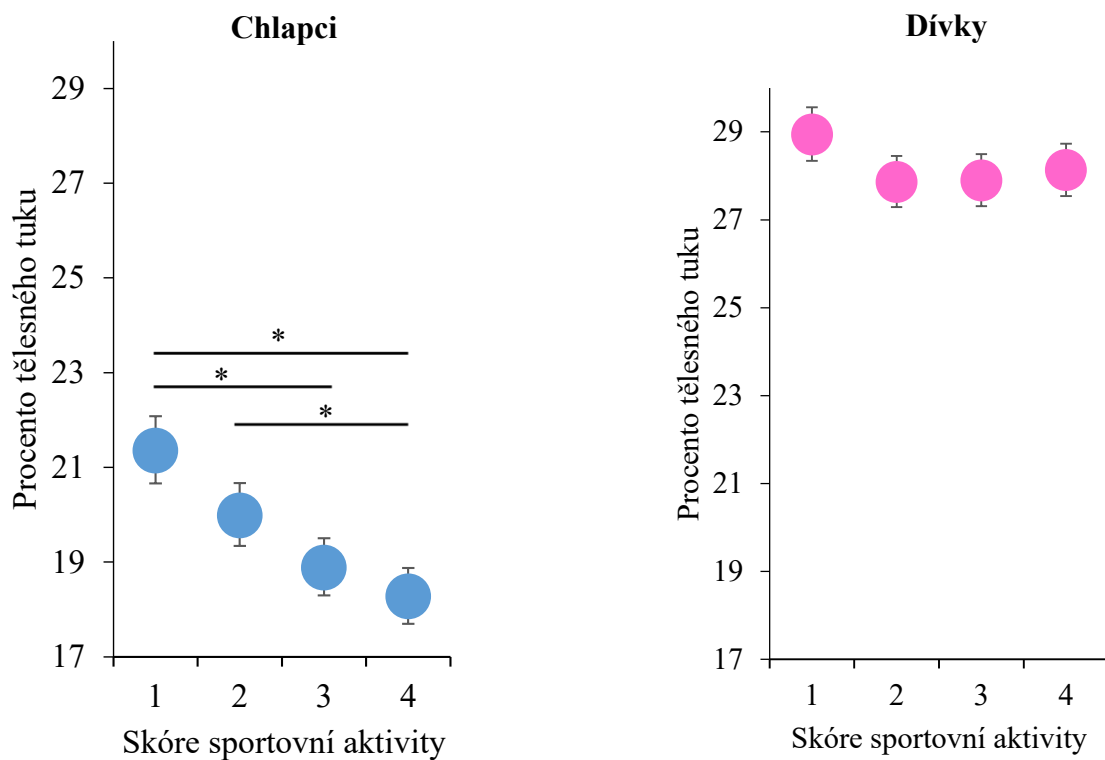
Následující Obrázky 9–20 ukazují výsledky asociační analýzy vlivu skóre sportovní aktivity na antropometrické a biochemické parametry u chlapců a dívek. Spojnice kategorií označené hvězdičkou značí, které kategorie se mezi sebou liší v uvedených parametrech na hladině významnosti <0,05.



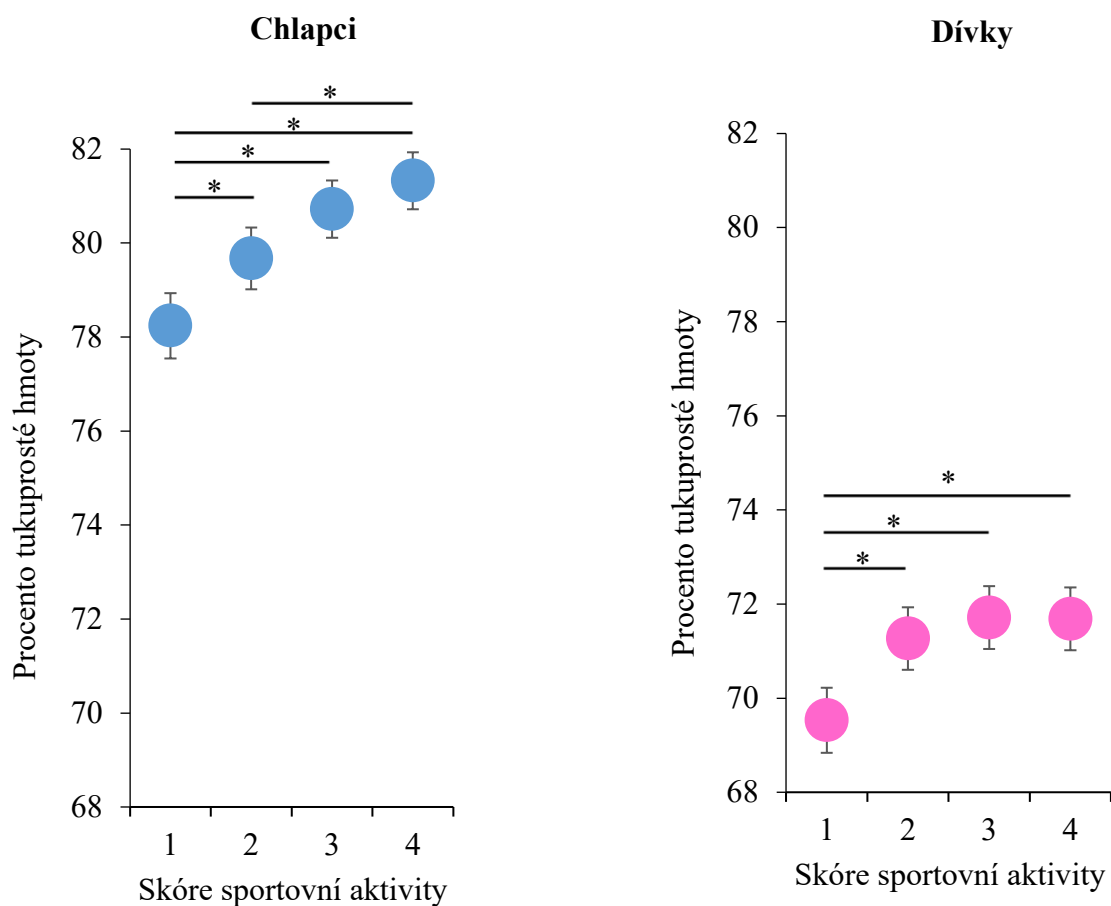
Obr. 9: Vztah SDS BMI a skóre sportovní aktivity u chlapců a dívek



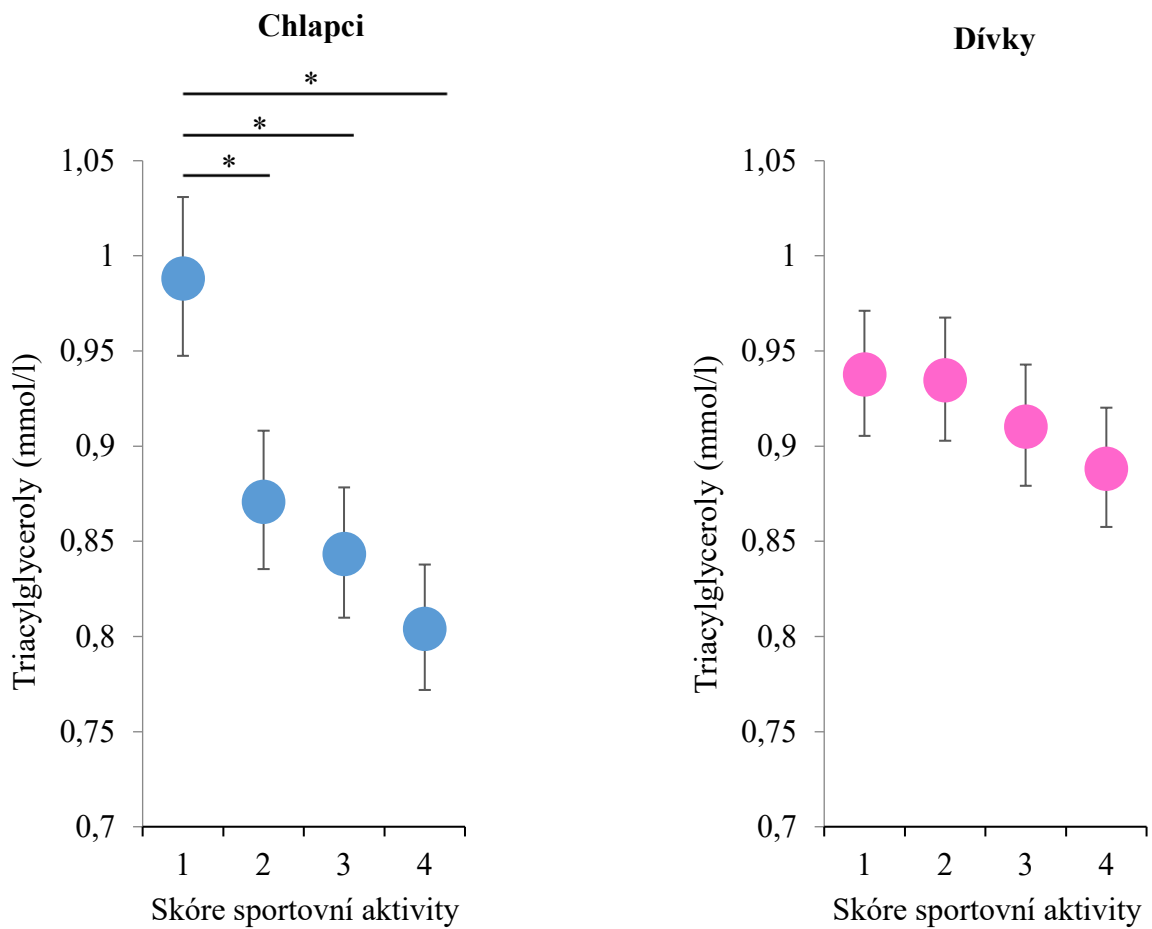
Obr. 10: Vztah WHtR a skóre sportovní aktivity u chlapců a dívek



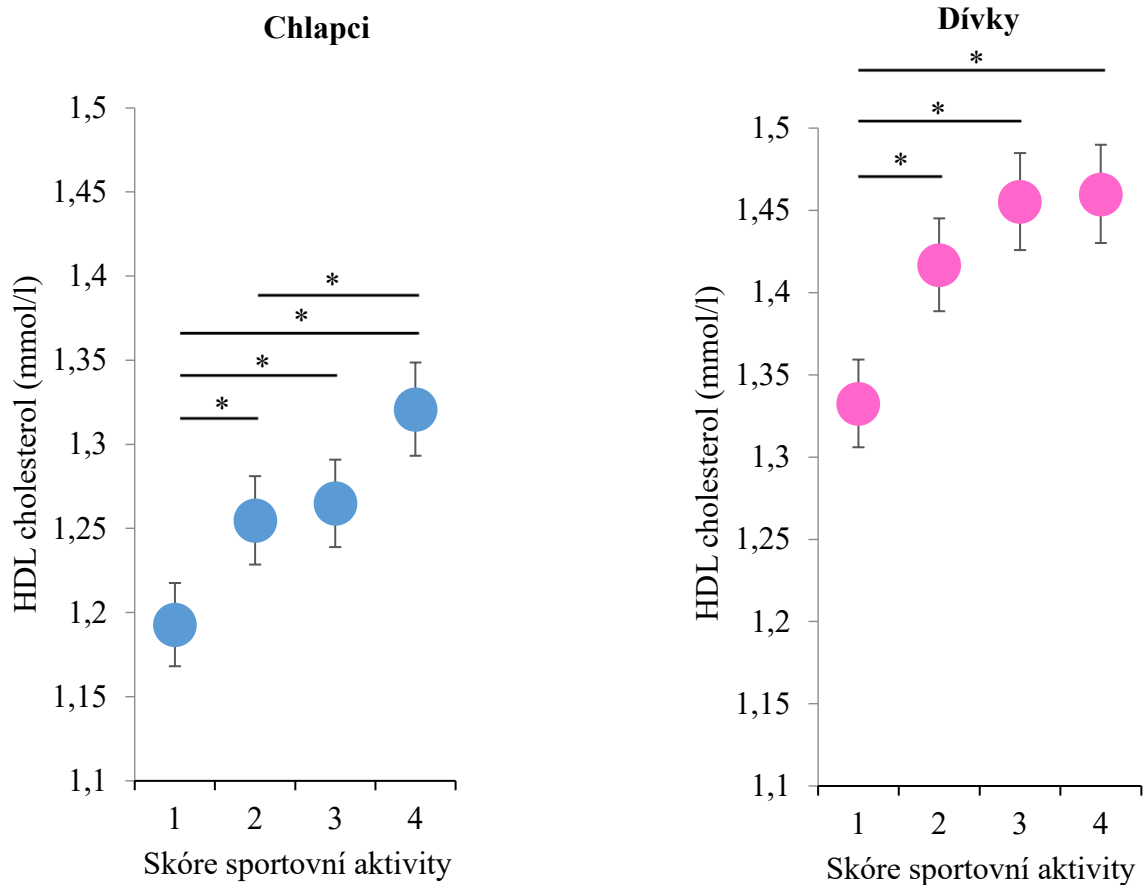
Obr. 11: Vztah procenta tělesného tuku a skóre sportovní aktivity u chlapců a dívek



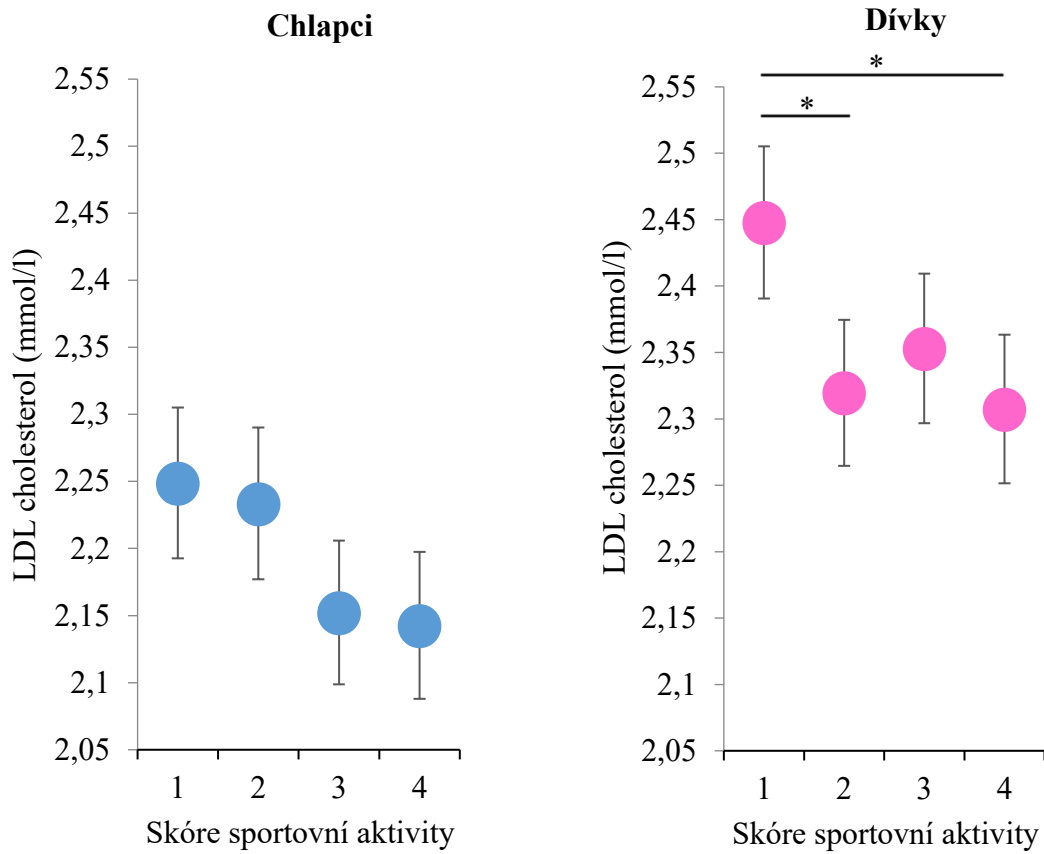
Obr. 12: Vztah procenta tukuprosté hmoty na skóre sportovní aktivity u chlapců a dívek



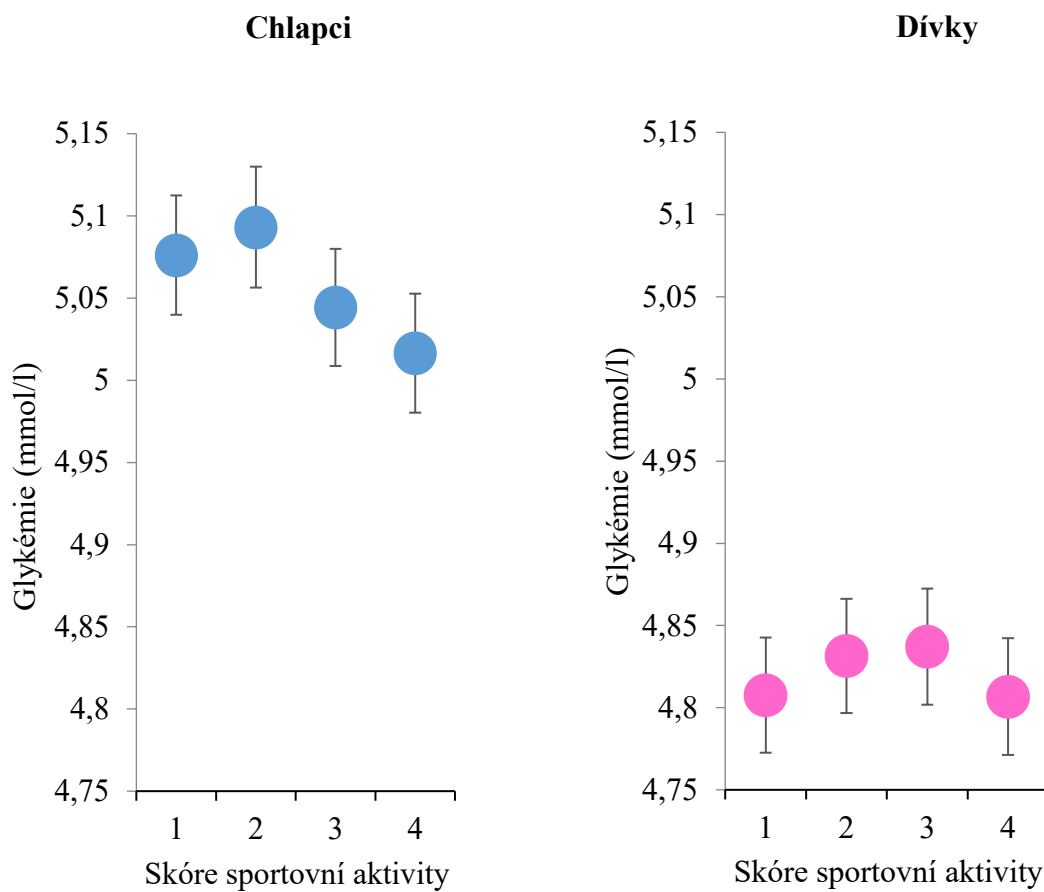
Obr. 13: Vztah koncentrace triacylglycerolů v séru na skóre sportovní aktivity u chlapců a dívek



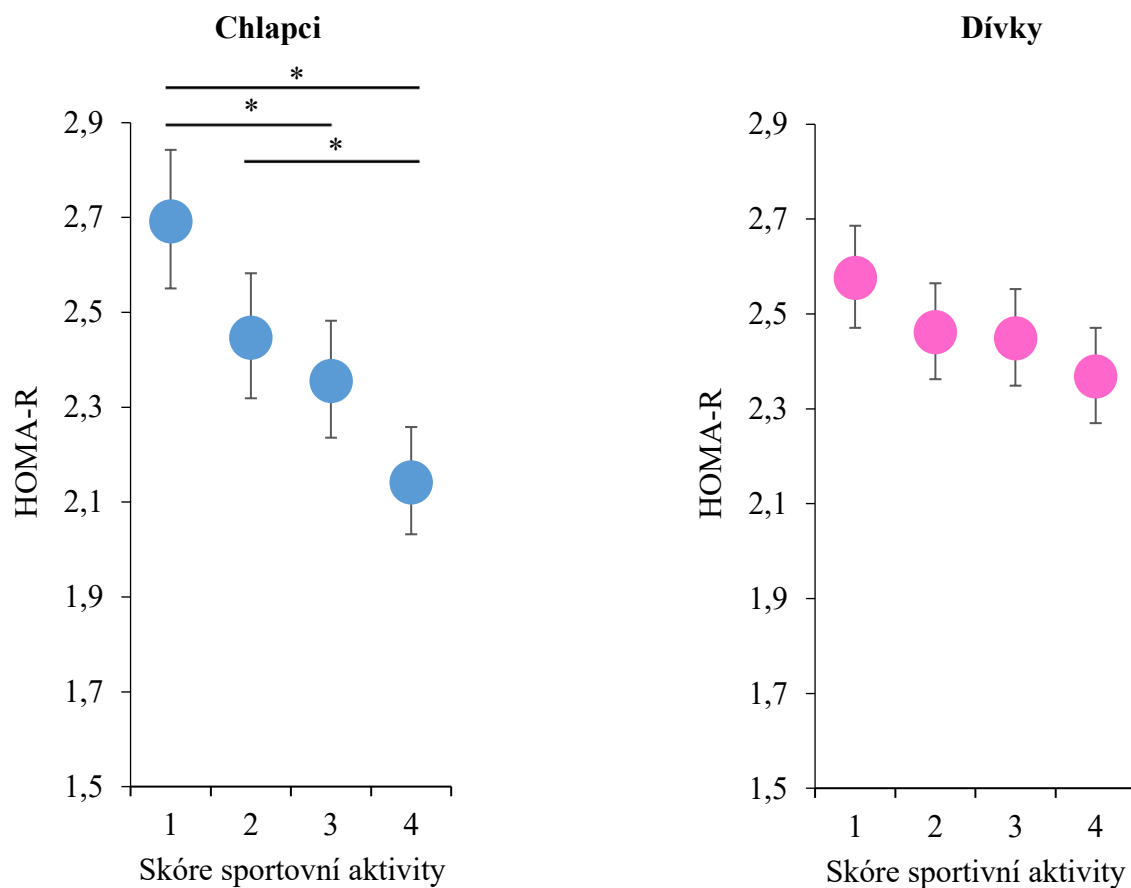
Obr. 14: Vztah koncentrace HDL-cholesterolu v séru na skóre sportovní aktivity u chlapců a dívek



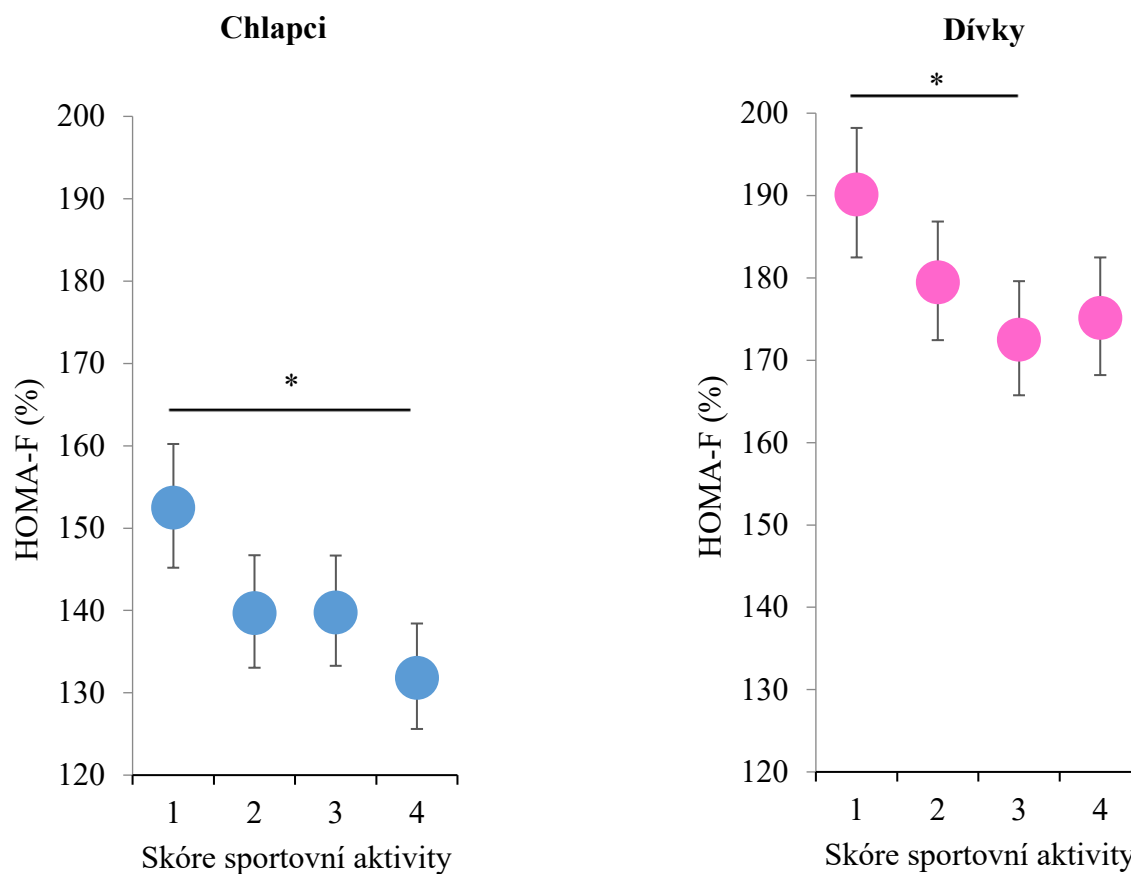
Obr. 15: Vztah koncentrace LDL-cholesterolu v séru a skóre sportovní aktivity u chlapců a dívek



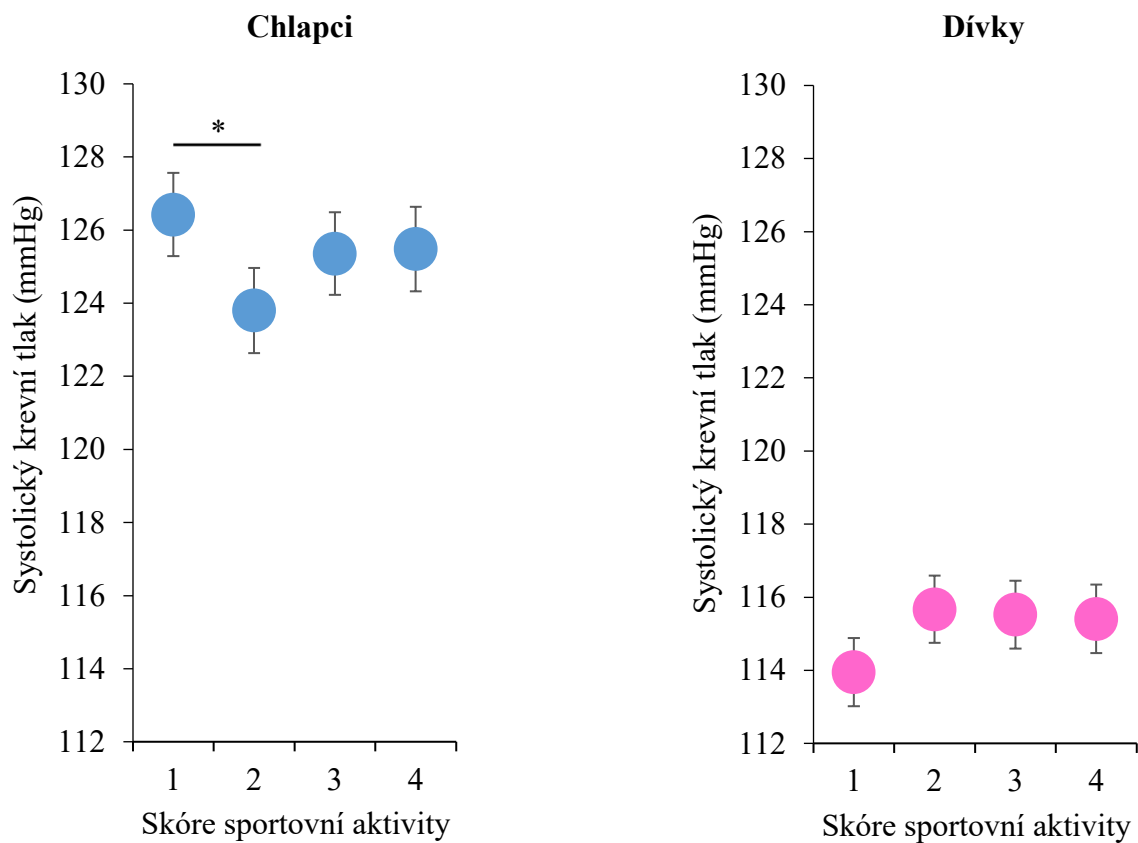
Obr. 16: Vztah hodnoty glykémie na lačno a skóre sportovní aktivity u chlapců a dívek



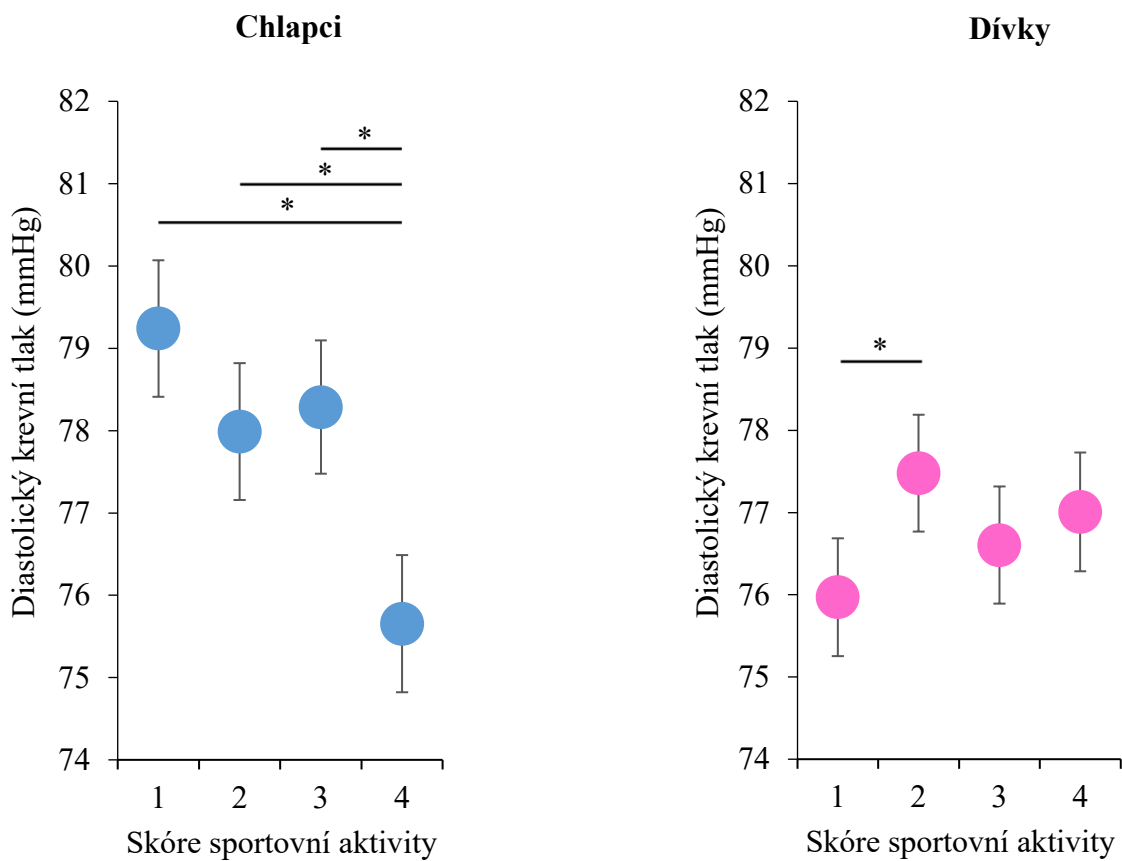
Obr. 17: Vztah hodnoty indexu HOMA-R a skóre sportovní aktivity u chlapců a dívek



Obr. 18: Vztah hodnoty indexu HOMA-F a skóre sportovní aktivity u chlapců a dívek



Obr. 19: Vztah hodnoty systolického krevního tlaku a skóre sportovní aktivity u chlapců a dívek



Obr. 20: Vztah hodnoty diastolického krevního tlaku a skóre sportovní aktivity u chlapců a dívek

V první části průřezové studie byl hodnocen vliv sportovní aktivity na tělesné složení a metabolické zdraví souboru 892 chlapců a 1055 dívek. Vliv sportovní aktivity byl hodnocen u těchto parametrů: SDS BMI, WHtR, procento celkového tělesného tuku, procento tukuprosté hmoty, hodnota triacylglycerolů, HDL a LDL-cholesterolu v krevním séru, hodnota glykémie na lačno, hodnoty indexů HOMA-R a HOMA-F a hodnoty systolického a diastolického tlaku.

Chlapci z neaktivnější skupiny měli v porovnání s chlapci z nejméně aktivní skupiny signifikantně: nižší SDS BMI, nižší WHtR, nižší procento celkového tělesného tuku, vyšší procento tukuprosté hmoty, nižší hladiny triacylglycerolů, vyšší hladiny HDL-cholesterolu, nižší hodnotu indexu HOMA-R, nižší hodnotu indexu HOMA-F a nižší hodnotu diastolického tlaku.

Dívky z neaktivnější skupiny měly ve srovnání s dívkami z nejméně aktivní skupiny signifikantně: nižší SDS BMI (ale průměrná hodnota byla vyšší než méně aktivní skupiny 3), nižší WHtR, vyšší procento tukuprosté hmoty, vyšší hladiny HDL-cholesterolu a nižší hladiny LDL-cholesterolu.

U chlapců ani u dívek nebyly statisticky významné rozdíly mezi neaktivnější a nejméně aktivními jedinci zaznamenány v případě hodnot glykémie na lačno a hodnot systolického krevního tlaku.

Získané výsledky svědčí o pozitivním vlivu sportovní aktivity na některé antropometrické a metabolické parametry u obou pohlaví, nicméně s jistými pohlavně specifickými rozdíly. Ačkoliv u dívek nebyl zjištěn signifikantní vliv sportovní aktivity na procento celkového tělesného tuku a vliv na SDS BMI nebyl tak výrazný jako u chlapců, signifikantně nižší hodnoty WHtR a vyšší hodnoty procenta tukuprosté hmoty jasně ukazují, že sportovní aktivita má u dívek pozitivní vliv na tělesné složení.

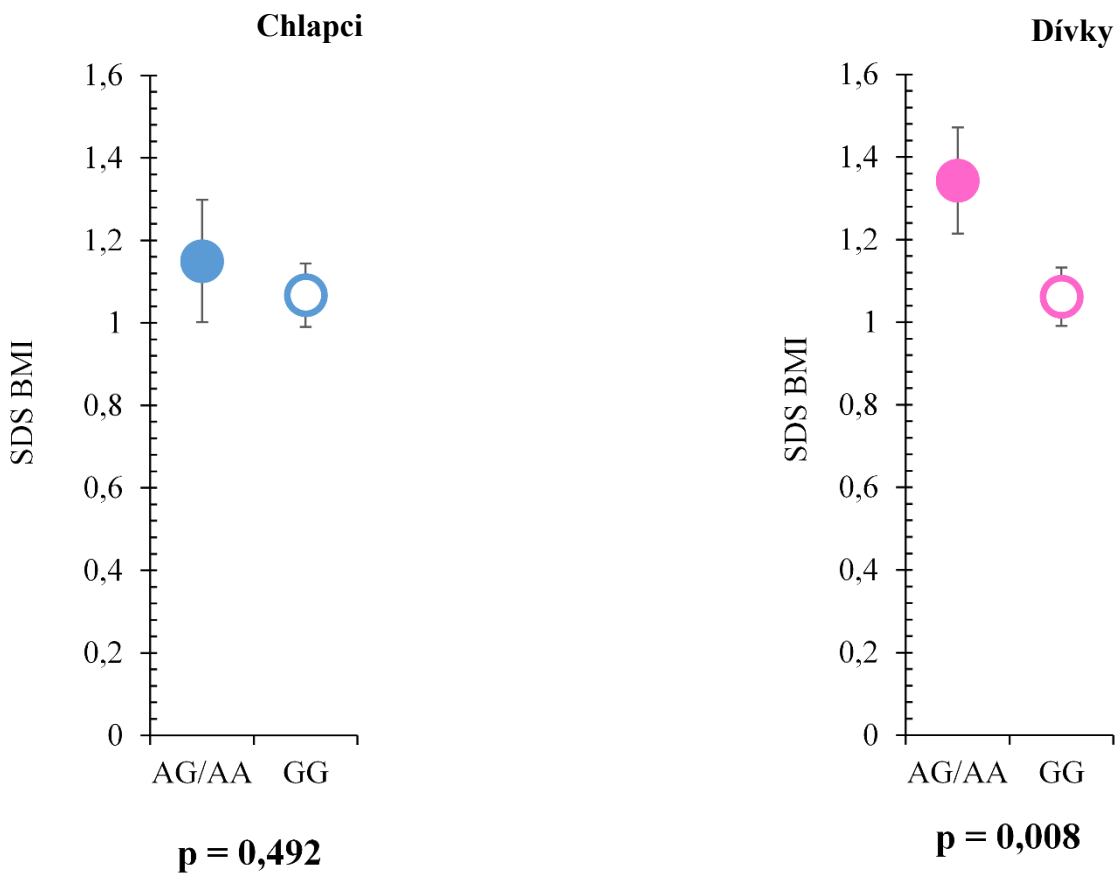
Výsledky analýzy asociace polymorfismu rs686989 v genu *ZBTB16* s fenotypy nadváhy a obezity potvrzují, že přítomnost minoritní alely A polymorfismu rs686989 v genotypu navyšuje šanci na přítomnost obezity. Statisticky významnou asociaci mezi genotypem a fenotypem nadváha/obezita vykazuje kodominantní a dominantní model. Jako vhodnější z modelů byl pro výslednou analýzu zvolen model dominantní z důvodu mírně vyššího OR, vyšší statistické významnosti a nižšího AIC vypovídajícího o vhodnosti aplikovaného modelu. Pro další analýzu byly proto skupiny minoritních homozygotů a heterozygotů spojeny do skupiny AG/AA a analyzovány oproti skupině GG. Výsledky analýzy asociace polymorfismu s fenotypem nadváha/obezita zobrazuje tabulka 4.

Tab. 4: Výsledky analýzy asociace polymorfismu rs686989 s nadváhou a obezitou v různých genetických modelech

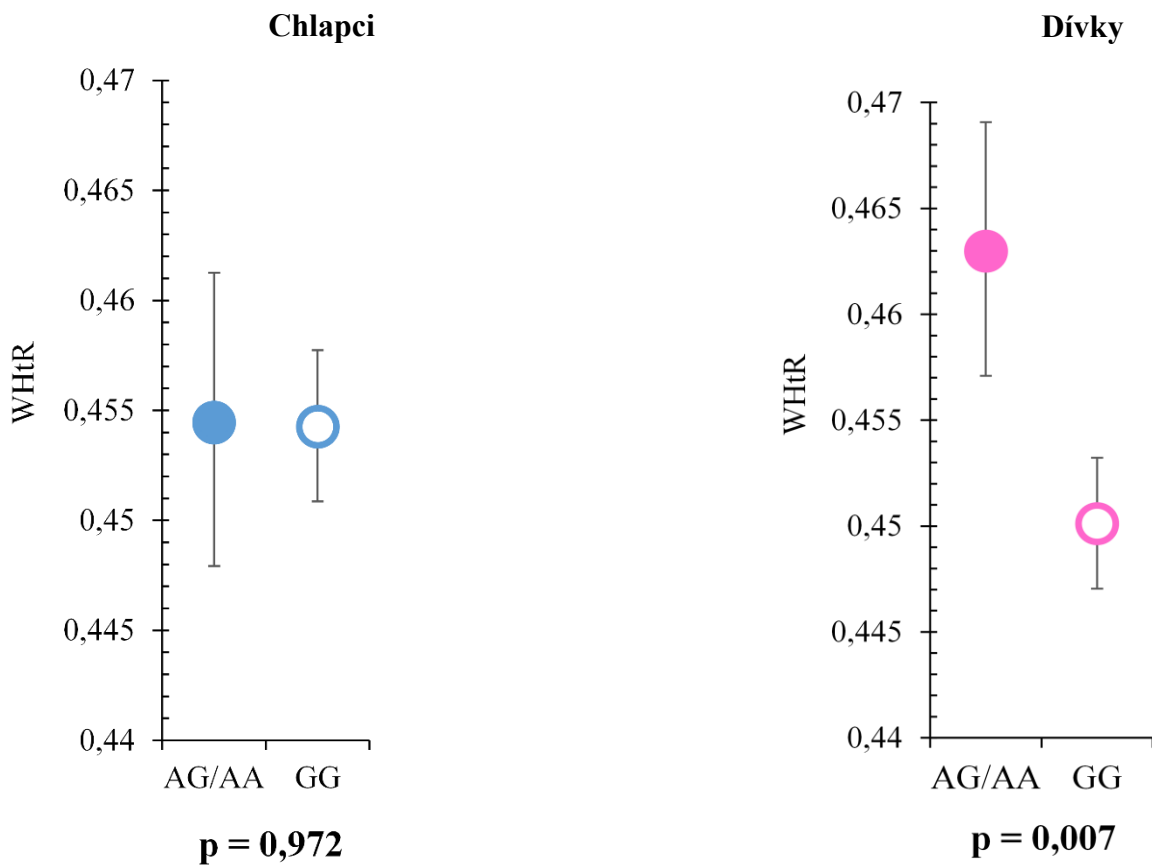
Model	Genotyp	Normostenie	Nadváha/obezita	OR (95% CI)	p-value	AIC
Kodominantní	G/G	830 (80,5 %)	896 (75,1 %)	1,00	0,0089	3067,9
	A/G	187 (18,1 %)	274 (23 %)	1,36 (1,10–1,67)		
	A/A	14 (1,4 %)	23 (1,9 %)	1,52 (0,78–2,98)		
Dominantní	G/G	830 (80,5 %)	896 (75,1 %)	1,00	0,0022	3066
	A/G–A/A	201 (19,5 %)	297 (24,9 %)	1,37 (1,12–1,68)		
Recesivní	G/G–A/G	1017 (98,6 %)	1170 (98,1 %)	1,00	0,29	3074,2
	A/A	14 (1,4 %)	23 (1,9 %)	1,43 (0,73–2,79)		

OR – poměr šancí, AIC – Akaikovo informační kritérium

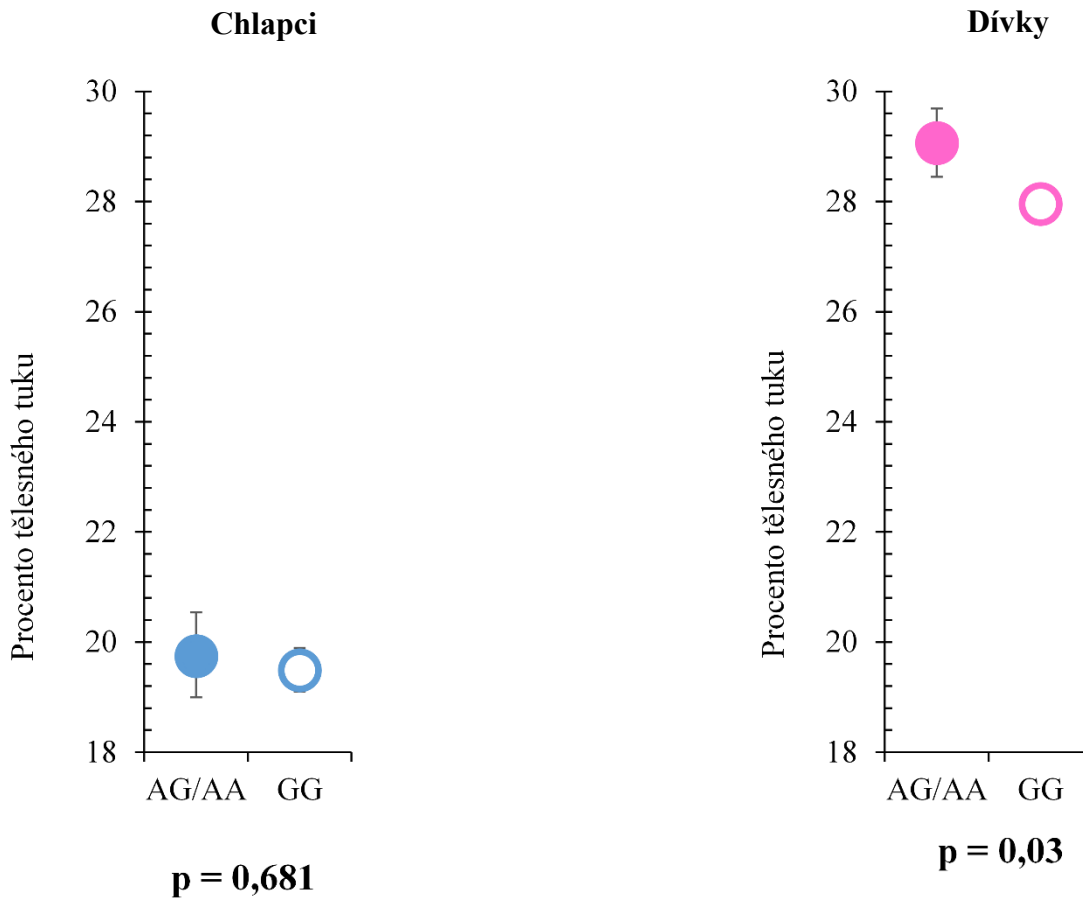
Následující Obrázky 21–32 ukazují výsledky asociační analýzy vlivu genotypu na antropometrické a biochemické parametry u chlapců a dívek.



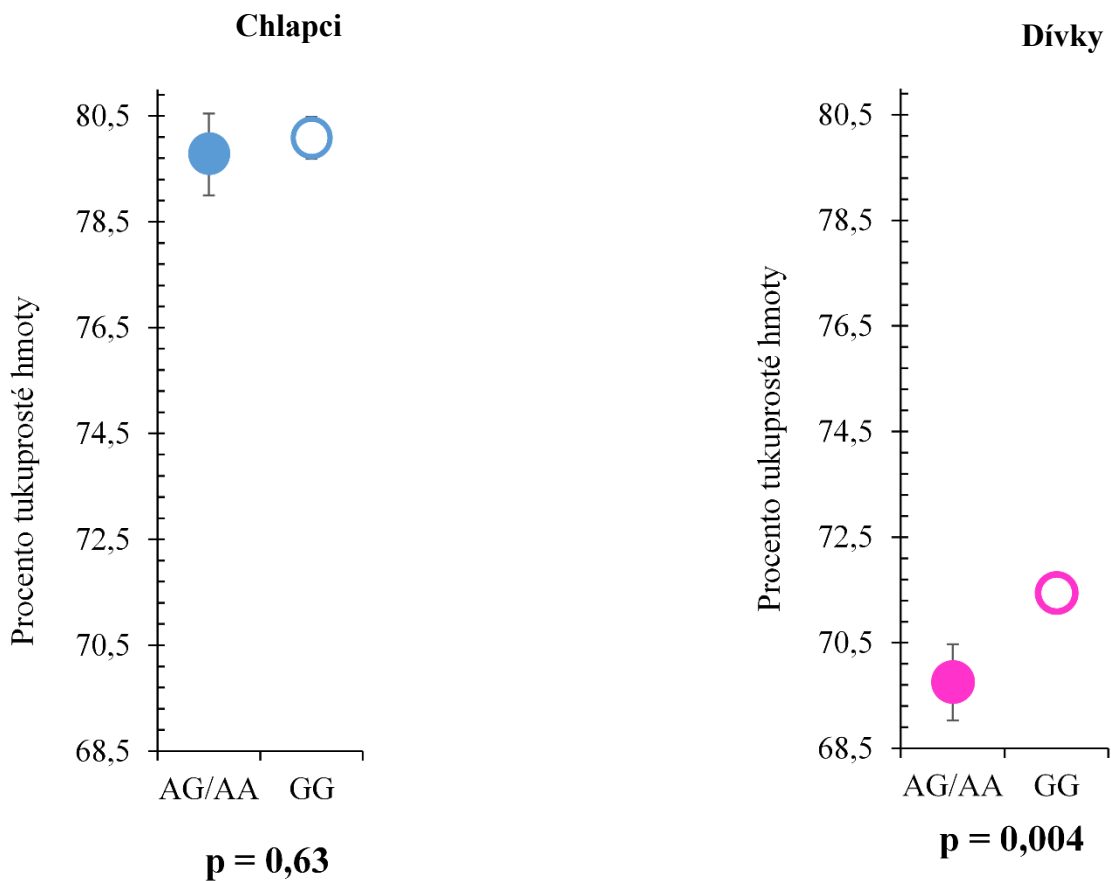
Obr. 21: Vztah hodnoty SDS BMI a přítomnosti minoritní alely A u chlapců a dívek



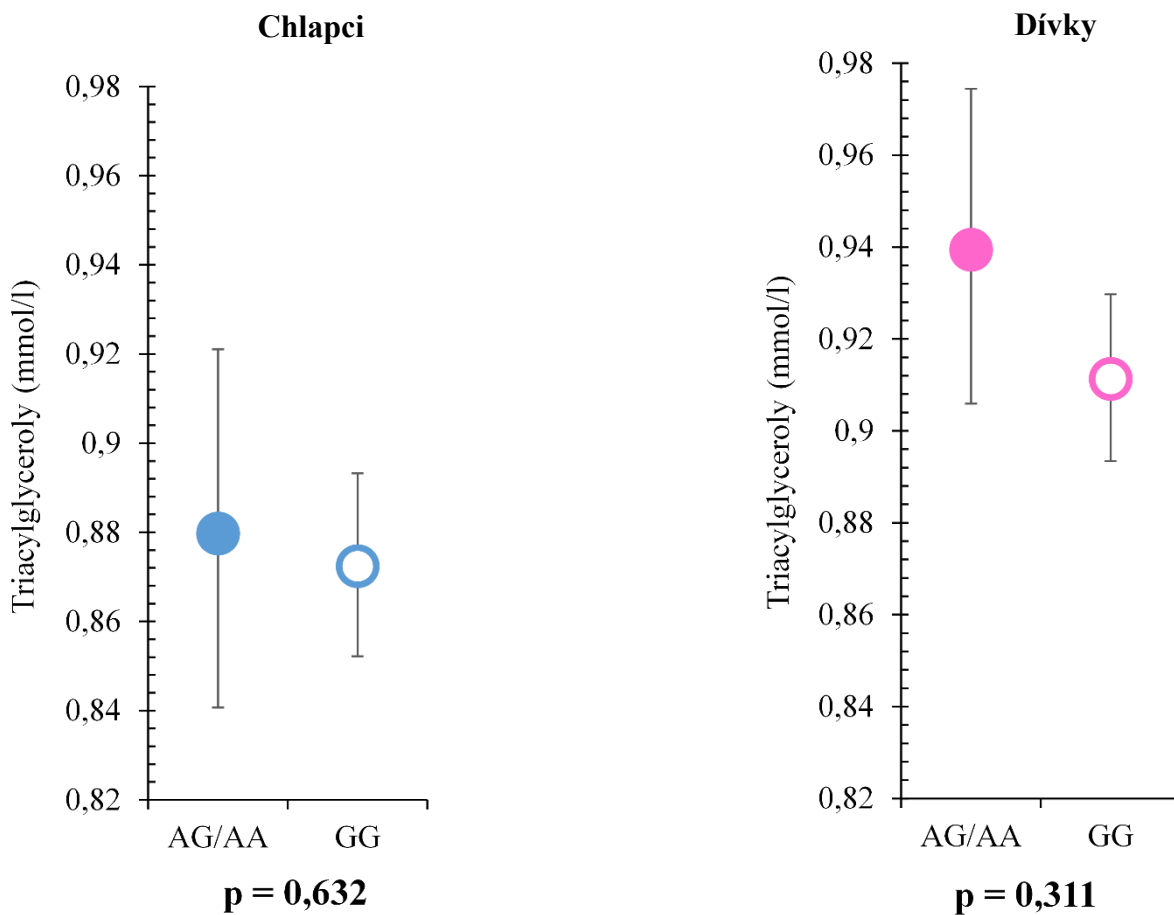
Obr. 22: Vztah hodnoty WHtR a přítomnosti minoritní alely A u chlapců a dívek



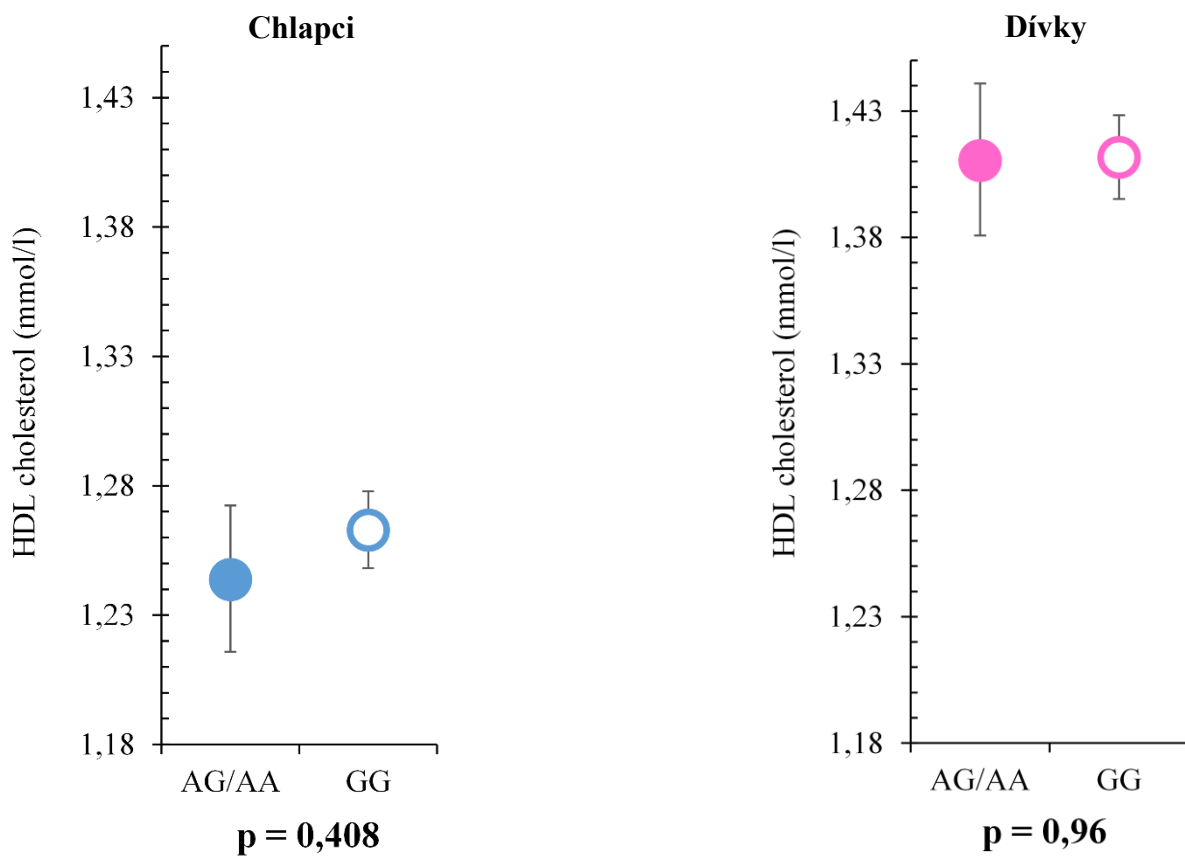
Obr. 23: Vztah procenta tělesného tuku a přítomnosti minoritní alely A u chlapců a dívek



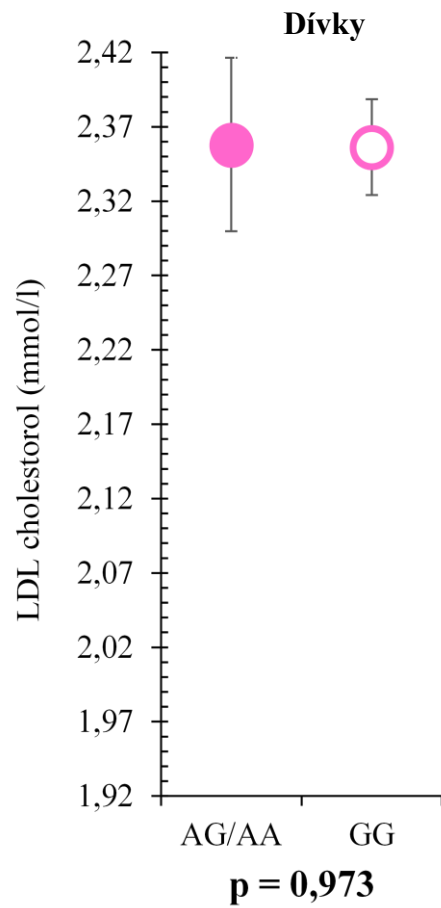
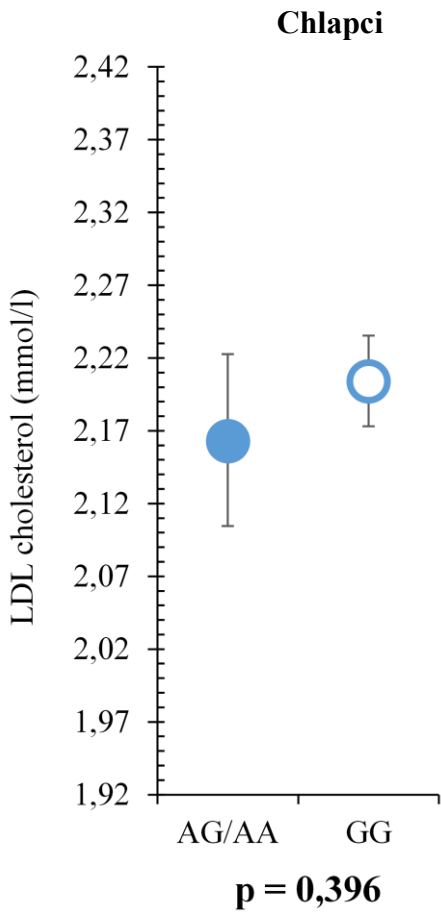
Obr. 24: Vztah procenta tukuprosté hmoty a přítomnosti minoritní alely A u chlapců a dívek



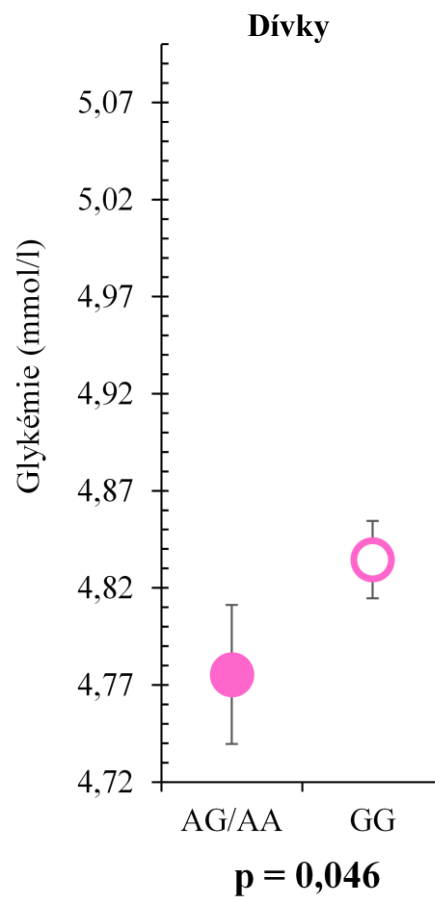
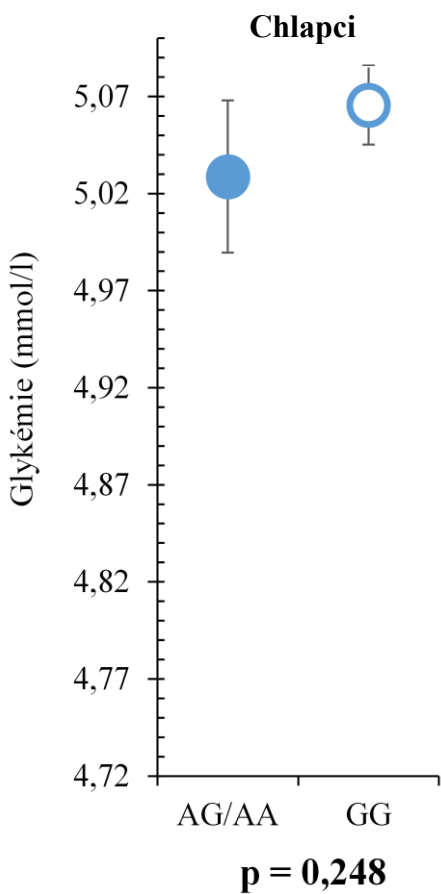
Obr. 25: Vztah koncentrace triacylglycerolů v séru a přítomnosti minoritní alely A u chlapců a dívek



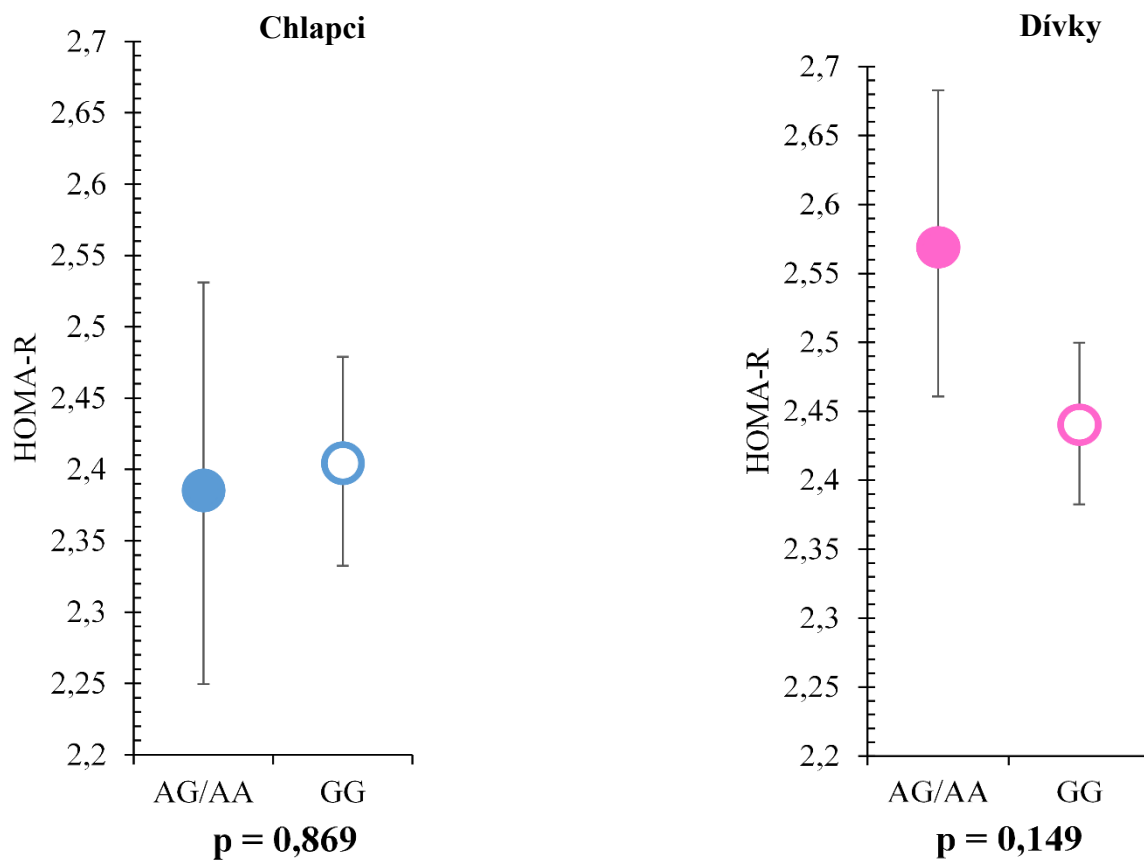
Obr. 26: Vztah koncentrace HDL-cholesterolu v séru a přítomnosti minoritní alely A u chlapců a dívek



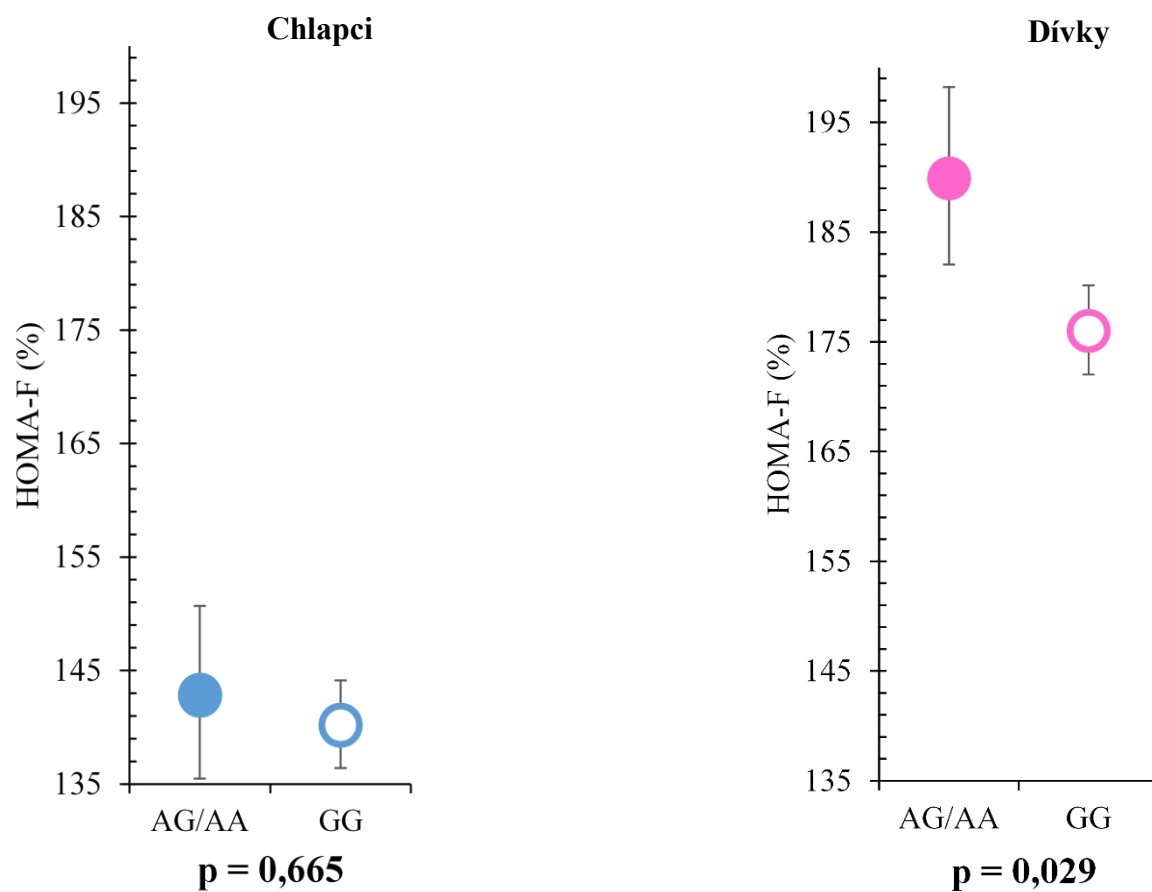
Obr. 27: Vztah koncentrace LDL-cholesterolu v séru a přítomnosti minoritní alely A u chlapců a dívek



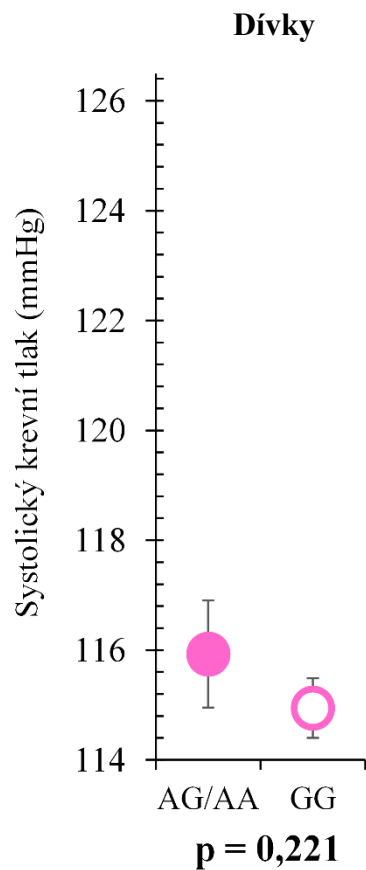
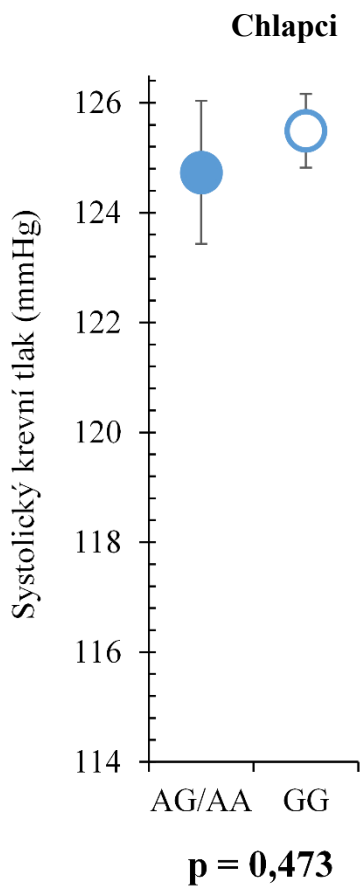
Obr. 28: Vztah hodnoty glykémie a přítomnosti minoritní alely A u chlapců a dívek



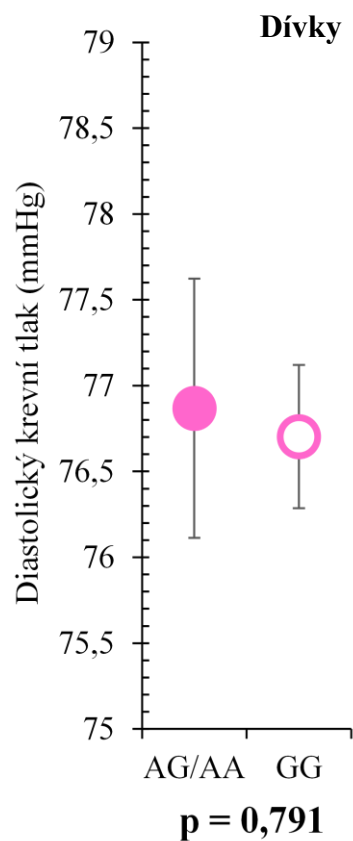
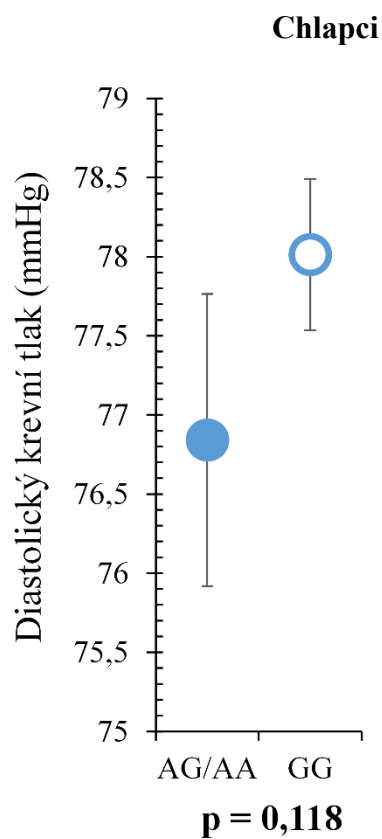
Obr. 29: Vztah hodnoty indexu HOMA-R a přítomnosti minoritní alely A u chlapců a dívek



Obr. 30: Vztah hodnoty indexu HOMA-F a přítomnosti minoritní alely A u chlapců a dívek



Obr. 31: Vztah hodnoty systolického krevního tlaku a přítomnosti minoritní alely A u chlapců a dívek



Obr. 32: Vztah hodnoty diastolického krevního tlaku a přítomnosti minoritní alely A u chlapců a dívek

Druhá část průřezové studie zjišťovala asociace polymorfismu rs686989 v genu *ZBTB16* s týmiž antropometrickými a biochemickými parametry.

U chlapců nebyla zjištěna žádná statisticky významná asociace mezi přítomností polymorfismu a jakýmkoliv ze sledovaných znaků.

U dívek s přítomností minoritní alely A bylo zaznamenáno statisticky významně: vyšší SDS BMI, vyšší WHtR, vyšší procento tělesného tuku, nižší procento tukuprosté hmoty, nižší hodnoty glykémie na lačno a vyšší hodnoty indexu HOMA-F.

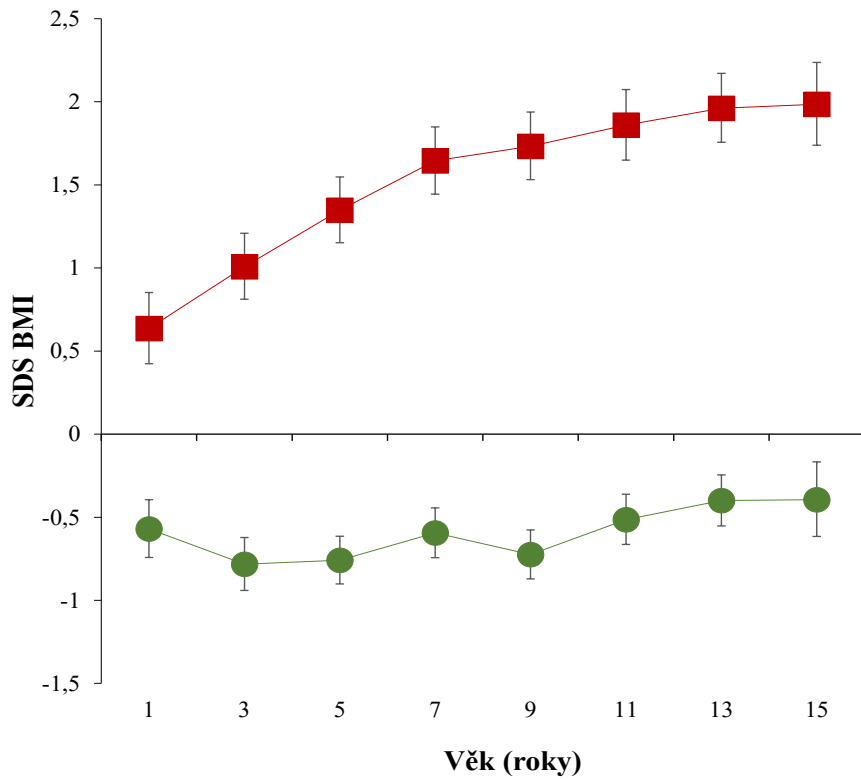
Výsledky naznačují, že jisté asociace polymorfismu rs686989 v genu *ZBTB16* s antropometrickými a biochemickými parametry mohou existovat, nicméně pro prokázání vlivu budou potřeba další studie, ideálně s početnými kohortami probandů. Důvod pro pohlavní rozdíly ve výsledcích asociační studie v tuto chvíli není možné vysvětlit.

8 Soubor – longitudinální studie

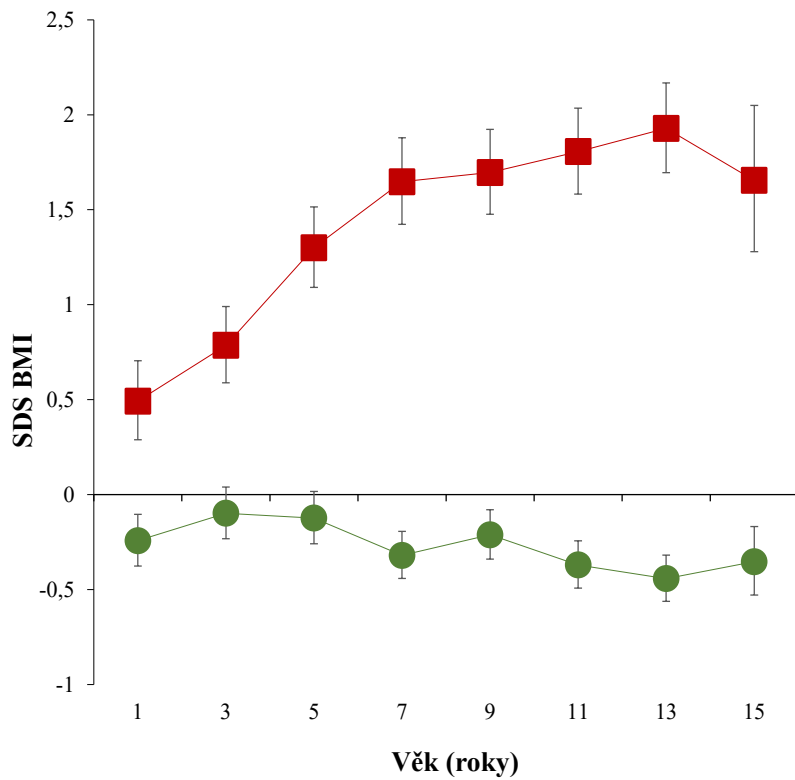
Soubor pro longitudinální studii tvořili jedinci, kteří se ve věku 11 až 18 let účastnili projektu COPAT a u kterých byly zároveň k dispozici záznamy o tělesné výšce a tělesné hmotnosti z alespoň 5 preventivních prohlídek. Preventivní prohlídky se standardně provádějí ve věku 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 a 15 let. Dalším kritériem pro zařazení do studie bylo podstoupení opakovaného vyšetření v rané dospělosti, tj. ve věku 18–26 let a dokončená sekvenace exomu. Podmínkou účasti ve studii byl souhlas s protokolem studie stvrzený podpisem informovaného souhlasu. Stanovená kritéria splňovalo celkem 98 probandů.

Probandi byli rozděleni do dvou skupin. První skupina zahrnovala jedince se zvýšeným rizikem obezity (**riziková skupina**). SDS BMI těchto jedinců se alespoň při pěti preventivních prohlídkách v dětství pohybovalo nad 50. percentilem a při měření v dospělosti bylo jejich BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$. Druhou skupinu (**neriziková skupina**) tvořili naopak jedinci, jejichž SDS BMI se alespoň při pěti preventivních prohlídkách pohybovalo pod 50. percentilem a v dospělosti jejich BMI nepřesahovalo hodnotu 25 kg/m^2 . Výsledný soubor rizikových jedinců tvořilo celkem 40 osob, z toho 18 mužů a 22 žen. Nerizikovou skupinu tvořilo 58 osob, z toho 24 mužů a 34 žen. Na obrázcích 33 a 34 je vidět trajektorie SDS BMI u chlapců a dívek v rizikové a nerizikové skupině.

K vytipování kandidátních polymorfismů pro analýzu genotypů mezi rizikovou a nerizikovou skupinou byla využita DNA jedinců, která byla v Endokrinologickém ústavu analyzována na žádost klinického genetika za účelem vyšetření monogenní obezity. Indikací k vyšetření těchto jedinců byl přetrvávající výskyt extrémní obezity (SDS BMI ≥ 4) vzniklý před 5. rokem života. Soubor tvořilo celkem 96 vzorků DNA.



Obr. 33: Trajektorie BMI rizikové (červená) a nerizikové (zelená) skupiny – chlapci



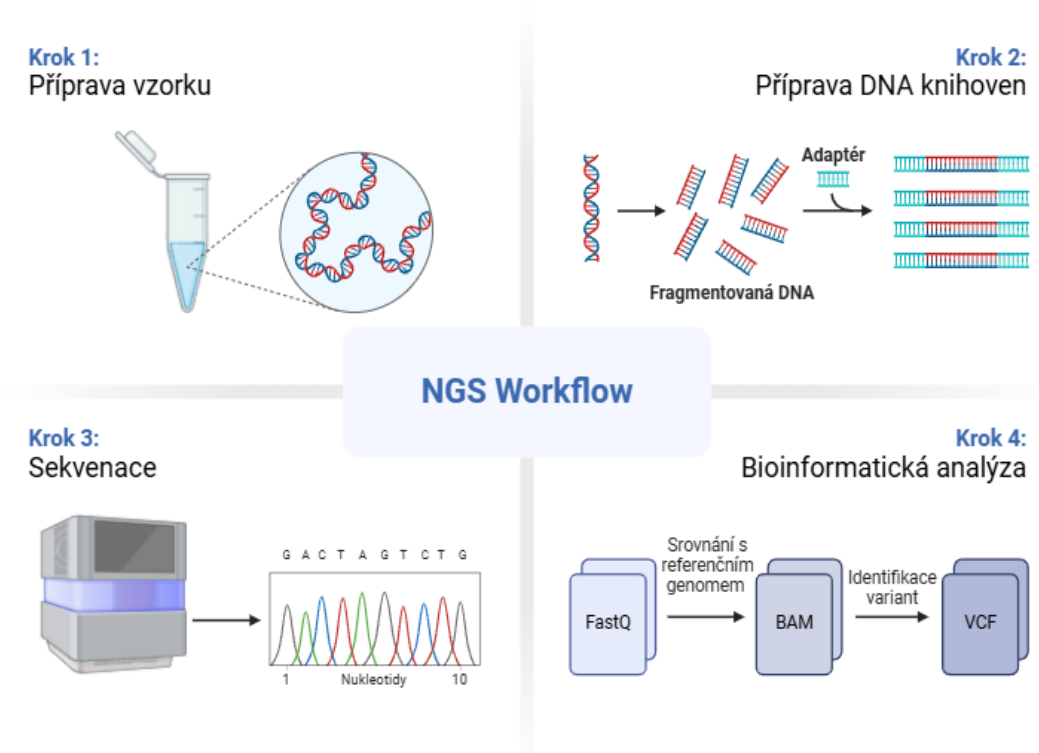
Obr. 34: Trajektorie BMI rizikové (červená) a nerizikové (zelená) skupiny – dívky

9 Metody – longitudinální studie

9.1. Sekvence exomů jedinců s podezřením na monogenní obezitu

Pro potřeby analýzy běžných variant genů spojených s monogenní obezitou byla zvolena technologie NGS, konkrétně metoda sekvenace exomu. Tato metoda představuje efektivní a relativně ekonomickou volbu pro identifikaci genetických variant spojených s monogenní obezitou, protože se zaměřuje na protein-kódující oblasti genomu. Tyto oblasti tvoří jen 1–2 % lidského genomu, ale mají zásadní klinický význam.

Samotné sekvenaci předchází relativně rozsáhlá přípravná fáze zahrnující izolaci DNA, její kvantifikaci a kontrolu kvality, přípravu DNA knihoven a následnou kontrolu kvality připravených knihoven. Výsledkem sekvenace je velké množství dat, která vyžadují další zpracování pomocí bioinformatické analýzy. Zjednodušené schéma procesu NGS zobrazuje obrázek 35.



Obr. 35: Schéma standardního procesu NGS (vlastní tvorba s využitím šablony z programu BioRender)

9.1.1. Příprava DNA knihoven

Při přípravě DNA knihoven určených k sekvenaci bylo postupováno dle oficiálních protokolů *Library Preparation EF 2.0 with Enzymatic Fragmentation and Twist Universal Adapter*

System a Twist Target Enrichment Standard Hybridization v2 Protocol poskytnutých k zakoupeným reagensům.

9.1.1.1. Izolace DNA

Pro izolaci DNA byly využity leukocyty periferní krve a byla prováděna pomocí poloautomatického přístroje QuickGene 610L (Fujifilm Life Science, Japan) za použití kitu QuickGene DNA whole blood kit L (KURABO Industries, Japan). Tato metoda je založena na vazbě DNA k porézní membráně z SiO₂.

Postup dle výrobce:

1. Proces uvolnění DNA z leukocytů pomocí lyzačního pufru obsahujícího chaotropní soli a Proteinázy K, inkubace v 65 °C. Vzniklý lyzát přemístěn do kolonek s membránou.
2. Navázání DNA na povrch membrány pomocí etanolu.
3. Promytí navázané DNA opakovaným průchodem promývacího pufru s obsahem ethanolu k odstranění nežádoucích zbytků proteinů.
4. Eluce DNA z membrány za použití elučního pufru, převedení do čisté zkumavky.
5. Koncentrace a čistota izolované DNA stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm.
6. DNA pro další použití naředěna na pracovní koncentraci 10 ng/μl v TE pufru a uchovávána při -20°C.

9.1.1.2. Změření koncentrace vstupní DNA

Koncentrace vstupní DNA byla ověřena fluorimetrickým měřením na přístroji Qubit 2.0. (Thermo Fisher Scientific, USA). Fluorimetrická metoda měření koncentrace DNA je založena na principu detekce fluorescenčního barviva, které po navázání do molekuly DNA emituje záření. Výsledná hodnota fluorescence je pomocí kalibrační křivky přístrojem převedena na koncentraci DNA. Všechny potřebné reagensy byly obsaženy v Qubit dsDNA BR (Broad Range) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Postup:

1. Příprava pracovního roztoku smícháním Qubit dsDNA BR pufru s Qubit dsDNA BR Reagent v poměru 1:200.

2. Přenesení 198 µl výsledného roztoku do 0,5ml plastových zkumavek, přidání 2 µl důkladně zvortexované DNA.
3. Změření koncentrace 2 standardů k sestavení kalibrační křivky. Standardy připraveny smícháním 190 µl roztoku z prvního kroku s 10 µl Qubit standardu.
4. Měření koncentrací roztoků po důkladném zvortexování.

9.1.1.3. Ředění vstupní DNA

Pro přípravu DNA knihoven bylo dle protokolu zapotřebí 50 ng vstupní DNA v roztoku s vodou o celkovém objemu 40 µl. Koncentrace výsledného roztoku DNA byla 1,25 ng/µl.

Postup:

1. Příprava 50 µl roztoku vody a DNA. Množství v roztoku vypočítáno v závislosti na změřených koncentracích DNA podle vzorce:

$$\text{Množství vzorku} = \frac{50}{\frac{\text{koncentrace DNA vzorku}}{1,25}}$$

$$\text{Množství vody} = 50 - \text{množství vzorku}$$

2. Přenesení 40 µl roztoku do 0,2ml tenkostěnných 8-stripových PCR zkumavek.
3. Zkumavky zcentrifugovány a umístěny na led.

9.1.1.4. Fragmentace DNA

Postup:

1. Příprava 10 µl fragmentačního mastermixu pro každý vzorek DNA. Mastermix získán smícháním 4 µl Frag/AT Buffer a 6 µl Frag/AT Enzymes. Roztok přenesen do zkumavek s DNA.
2. Důkladné promíchání roztoku pipetováním pro dosažení konzistentních délek vzniklých fragmentů.
3. Zkumavky umístěny do cykleru a spuštěn program pro fragmentaci (viz tabulka 5)

Tab. 5: Program cyklu pro fragmentaci

Fáze	Teplota	Čas
1	4 °C	–
2	37 °C	20 minut
3	65 °C	30 minut
4	4 °C	–
Teplota víka	105 °	

- Po dokončení programu zkumavky vyjmuty ze cyklu a umístěny na led.

9.1.1.5. Připojení adaptérů

Adaptéry jsou krátké sekvence DNA, které se váží na konce fragmentů DNA, čímž pomáhají chránit konce fragmentů před degradací. Kromě toho obsahují místa, která slouží jako vazebné sekvence pro primery během PCR amplifikace. Při samotné sekvenaci jsou důležité pro uchycení DNA fragmentů na povrchu flow cell sekvenačního přístroje.

Postup:

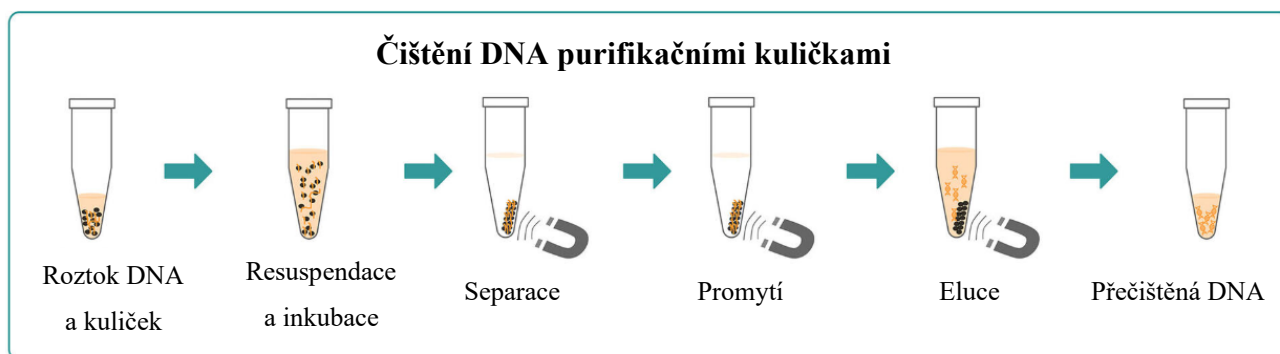
- Do zkumavek s fragmentovanou DNA přidáno 5 µl Twist Universal Adapters, obsah zkumavky promíchán pomalým pipetováním a poté přidáno 20 µl Ligation Master Mix.
- Výsledný roztok promíchán pipetováním a zcentrifugován.
- Zkumavky s roztokem umístěny do cyklu a 20 minut inkubovány při 20 °C.

9.1.1.6. Přečištění magnetickými kuličkami

Po skončení programu následovalo přečištění roztoku pomocí DNA Purification Beads (po 30 minutách temperování kuliček při pokojové teplotě). Purifikační kuličky jsou pokryty magnetickým materiálem a jsou afinitní k DNA.

V prvním kroku se DNA fragmenty vážou na povrch magnetických kuliček, poté v přítomnosti magnetického pole dochází k oddělování kuliček s navázanou DNA od odpadních zbytků (volné adaptéry, nenavázané fragmenty DNA, zbytky enzymů a pufrů). Důkladné pročištění je zajištěno promýváním ethanolem, který DNA udržuje pevně přichycenou k povrchu kuliček. Následuje eluce DNA z povrchu kuliček v přítomnosti vody a odejmutí přečištěné DNA

pro další reakce. Zjednodušené schéma procesu čištění magnetickými kuličkami zobrazuje obrázek 36.



Obr. 36: Proces přečištění DNA purifikačními kuličkami. Převzato z URL6.

Postup:

1. Ke vzorkům přidáno 60 μ l purifikačních kuliček a roztok 5 minut inkubován při pokojové teplotě.
2. Přemístění vzorků na magnetickou destičku, kde kuličky díky svým magnetickým vlastnostem zformují kompaktní peletku. Odsátí čirého supernatantu.
3. Přidání 200 μ l 80% ethanolu k peletce a inkubace roztoku 1 minutu při pokojové teplotě.
4. Odsátí ethanolu a 1x opakování procesu přečištění ethanolom.
5. Po druhém odsání ethanolu sušení peletky 5 minut na vzduchu a následně přidání 17 μ l vody.
6. Zhomogenizování roztoku pipetováním a 2minutová inkubace při pokojové teplotě.
7. Přemístění zkumavek na magnetický stojan – zformování peletky.
8. Odsátí čirého supernatantu do předpřipravených 0,2ml tenkostěnných 8-stripových PCR zkumavek.

9.1.1.7. PCR amplifikace

PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifikace umožňuje rychlé a selektivní kopírování požadovaných sekvencí DNA.

Postup:

Přidání 10 µl Twist UDI Primers do zkumavek s přečištěnou DNA a promíchání pipetováním. Jedná se o krátké oligonukleotidy, které slouží jako specifické indexy pro označení jednotlivých vzorků.

1. Přidání 25 µl Equinox Library Amp Mix (2x). Promíchání pipetování a centrifugace. Mix obsahuje všechny složky důležité pro amplifikaci (polymeráza, dNTPs, optimalizovaný pufr).
2. Zkumavky umístěny do cykleru a spuštěn program pro PCR (viz tabulka 6)

Tab. 6: Program cykleru pro PCR

Fáze	Teplota	Čas	Opakování
Iniciace	98 °C	45 sekund	1
Denaturace	98 °C	15 sekund	8
Annealing	60 °C	30 sekund	
Elongace	72 °C	30 sekund	
Finální elongace	72 °C	1 minuta	1
Hold	4 °C	–	–
Teplota víka	105 °C		

9.1.1.8. Přečištění PCR produktů

Po skončení programu následovalo přečištění produktů PCR pomocí DNA Purification Beads. Postup byl stejný jako v kroku 9.1.1.6. Zde se čištěním odstraňují převážně nenávané indexy či případně vzniklé dimery indexů. Výsledkem přečištění bylo získání 20 µl čirého supernatantu obsahujícího DNA knihovny s připojenými specifickými indexy.

9.1.1.9. Kontrola kvality knihoven

Kvantifikace knihoven

Nejprve byla přístrojem Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) změřena koncentrace DNA získaných knihoven (viz 9.1.1.2.). Protokol udává, že při 50 ng vstupní genomické DNA o vysoké kvalitě by po 20minutové fragmentaci při 37 °C a 6 cyklech PCR měly finální koncentrace knihoven dosahovat alespoň 50 ng/µl. Hodnoty koncentrací pod 50 ng/µl mohou

být důsledkem nepřesností při přípravě vzorků a mohou vést k nízké diverzitě knihoven po hybridizaci.

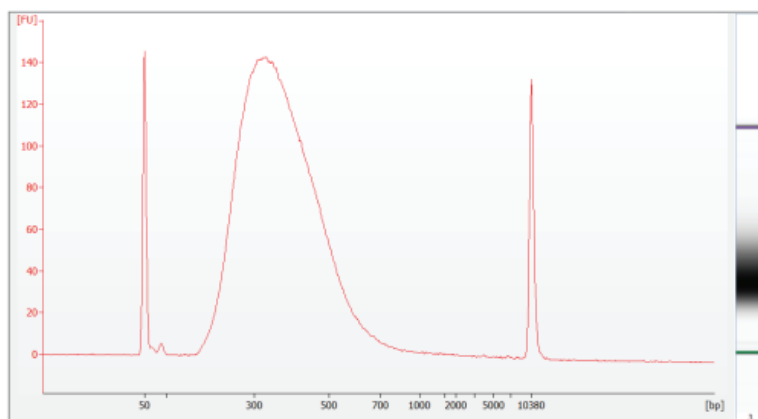
Velikostní rozložení fragmentů DNA v knihovně – validace

Ověřeno pomocí přístroje Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) s využitím kitu Agilent DNA 7500 Assay a Agilent High Sensitivity DNA Chip (Agilent Technologies, USA). Funkce bioanalyzáru je založena na principu kapilární elektroforézy, kdy se DNA fragmenty na základě své velikosti separují při průchodu kapilárou.

Při přípravě gelu i čipu bylo postupováno dle standardního protokolu:

1. Do jamek čipu do vyznačených pozic nanese 9 μ l gel-dye mixu, 5 μ l loadovacího markeru, 1 μ l DNA žebříčku a 1 μ l jednotlivých knihoven.
2. Vortexování připraveného čipu po dobu 1 minuty a následně vložení do bioanalyzáru.

Výstupem bioanalyzáru jsou elektroforeogramy zobrazující rozložení velikostí fragmentů ve vzorku. Dle protokolu by při 50 ng vstupní genomické DNA o vysoké kvalitě po 20minutové fragmentaci při 37 °C a 6 cyklech PCR měly fragmenty v knihovnách dosahovat průměrně délek v rozmezí 350–425 bp. Reprezentativní elektroforeogram pro knihovny připravované tímto postupem zobrazuje obrázek 37.



Obr. 37: Reprezentativní elektroforeogram pro knihovny připravované naším postupem. Převzato z protokolu *Library Preparation EF 2.0 with Enzymatic Fragmentation and Twist Universal Adapter System*

9.1.1.10. Příprava knihoven na hybridizaci

V rámci přípravy knihoven na hybridizaci dochází nejprve k tzv. poolování nebo též spojování knihoven do poolů, při kterém je větší množství předpřipravených knihoven umístěno do jedné

společné zkumavky a dále se s nimi pracuje jako s jedním vzorkem. V našem případě jsme tvořili pooly po osmi vzorcích. Množství jednotlivých knihoven, které bylo do poolu přidáno, bylo dopočítáno na základě výsledků koncentrací z přístroje Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) z kroku 9.1.1.9., aby tak všechny knihovny byly v poolu zastoupeny rovnoměrně. Po vytvoření poolů byly knihovny vysušeny pomocí přístroje Digital Series SpeedVac Systems (Thermo Fisher Scientific, USA).

9.1.1.11. Hybridizace

Při hybridizaci dochází k připojení hybridizačních sond do míst exonů DNA připravovaných knihoven. Hybridizační sondy jsou jednovláknové oligonukleotidy navrženy tak, aby se komplementárně vázaly k požadovaným sekvencím DNA, čímž je umožněno zachycení cílových sekvencí (tedy exonů) a jejich následná amplifikace – tzv. target enrichment.

Postup:

1. Příprava roztok se sondami – probe solution. Probe solution pro každý pool obsahoval 20 μ l Hybridization Mix, 4 μ l Twist Fixed Panel a 4 μ l vody pro injekční účely.
2. Resuspendace vysušených knihoven přidáním 5 μ l Blocker solution a 7 μ l Universal blockers do zkumavky. Tyto roztoky obsahují krátké oligonukleotidy, které se při hybridizaci váží na již dříve připojené univerzální adaptéry a indexy, čímž zamezují jejich rozpoznání sondami z probe solution. Hybridizace tak výhradně probíhá mezi sondami a cílovými sekvencemi DNA.
3. Umístění roztoku probe solution i resuspendovaných knihoven na 2 minuty do cykleru s teplotou nastavenou na 95 °C (víko 105 °C). V tomto kroku dochází k denuraci vláken DNA sond i knihoven, aby tak při hybridizaci mohlo probíhat komplementární párování jednovláknových DNA.
4. Následná inkubace 5 minut při pokojové teplotě.
5. Přenesení obsahu probe solution do zkumavek s knihovnami.
6. Přidání 30 μ l Hybridization Enhancer a umístění zkumavek do cykleru, hybridizace 16 hodin při teplotě 70 °C (víko 85 °C).

9.1.1.12. Navázání produktů hybridizace k streptavidinovým kuličkám

V tomto kroku jsou požadované sekvence DNA navázány na streptavidinové kuličky,

Postup:

1. Příprava poolu knihoven: 100 μ l Streptavidin Binding Beads (po 30 minutách temperování při pokojové teplotě) smíchání s 200 μ l Binding Buffer. Promíchání pipetováním a přenesení na magnetický stojánek. Po zformování peletky odsátí čirého supernatantu a přidání pufru. Promytí 3x opakovat.
2. Po třetím promytí ke kuličkám přidáno 200 μ l Binding Buffer, důkladné zvortexování roztoku a následné umístění na 10 minut do cykleru při teplotě 68 °C.
3. Po deseti minutách do zkumavek roztoku streptavidinových kuliček přidán obsah zkumavek hybridizační reakce. Aby se streptavidinové kuličky vázaly na požadované produkty hybridizace, je důležité, aby přenesení poolů knihoven ke kuličkám probíhalo ve vyhřátém cykleru a nedocházelo tak ke kolísání teplot roztoků.
4. Inkubace roztoku kuliček a hybridizovaných knihoven 5 minut v cykleru při 68 °C.
5. Po vytažení ze cykleru zkumavky umístěny na magnetický stojan a po zformování peletky odsátí čirého supernatantu.
6. Promytí magnetických kuliček 200 μ l Standard Wash Buffer 1 a následně 200 μ l Wash Buffer 2. Před každým promytím roztok 5 minut inkubován v cykleru nejprve při 68 °C a poté při 48°C.
7. Po posledním promytí odsátí čirého supernatantu a přidání 45 μ l vody pro injekční účely.
8. Homogenizace roztoku pipetováním a umístění na led.

9.1.1.13. PCR amplifikace

Postup:

1. Přenesení 22,5 μ l homogenizovaného roztoku kuliček a vody do čistých 0,2 ml PCR zkumavek.
2. Přidání reagentů pro PCR: 2.5 μ l Amplification Primers a 25 μ l Equinox Library Amp Mix (2x).
3. Umístění zkumavek do cykleru a spuštění program pro PCR (viz tabulka 7).

Tab. 7: Program cyklu pro PCR amplifikaci

Fáze	Teplota	Čas	Opakování
Iniciace	98 °C	45 sekund	1
Denaturace	98 °C	15 sekund	7
Annealing	60 °C	30 sekund	
Elongace	72 °C	30 sekund	
Finální elongace	72 °C	1 minuta	1
Hold	4 °C	–	–
Teplota víka	105 °C		

9.1.1.14. Přečištění PCR produktů

Po skončení programu následovalo přečištění produktů PCR pomocí DNA Purification Beads. Postup byl stejný jako v kroku 9.1.1.6. Tento krok zajišťuje čistotu výsledných DNA knihoven, což je důležité pro efektivní sekvenaci a kvalitu výstupních dat.

Po přečištění bylo 30 µl čirého supernatantu přeneseno do 0,2 ml PCR zkumavek.

9.1.1.15. Výsledná kontrola kvality připravených knihoven

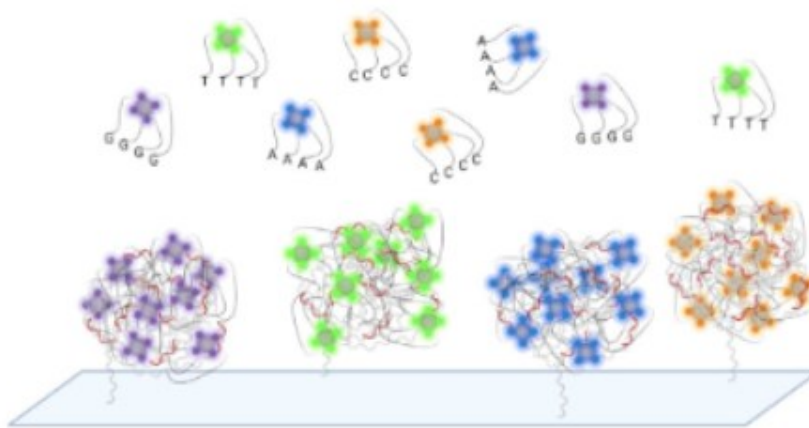
Závěrečným krokem před odesláním knihoven na sekvenaci je provedení validace a kvantifikace připravených knihoven. Postup byl stejný jako v kroku 9.1.1.2. a 9.1.1.9.

9.1.2. Sekvenace

Připravené knihovny byly odeslány k sekvenaci do společnosti DYNEX TECHNOLOGIES, která pro sekvenace využívá sekvenátor AVITI (Element Biosciences, USA). Tento sekvenátor využívá technologii *Rolling Circle Amplification* a speciální molekuly zvané avidity. Avidity jsou fluorescenčně značené molekuly které se v přítomnosti polymerázy váží na komplementární nukleotidy a umožňují tak rozlišení jednotlivých bází DNA a následné stanovení sekvence nukleotidů v řetězci.

Před sekvenací je DNA denaturována na jednořetězcovou formu. V sekvenátoru je fragmentovaná jednovláknová DNA knihoven pomocí adaptorových sekvencí přichycena na flowcellu, skleněnou destičku pokrytou oligonukleotidy komplementárními k adaptorovým sekvencím. Fragments jsou pomocí *Rolling Circle Amplification* cirkularizovány a amplifikovány do podoby tzv. polonií. Sekvenace probíhá cyklickým přidáváním směsi aviditů a polymerázy, přičemž fluorescenční signály specifické pro jednotlivé báze jsou

detekovány přístrojem (Arslan et al., 2023). DNA amplifikovanou do podoby polonií a s navázanými avidity zobrazuje obrázek 38.



Obr. 38: Polonie s navázanými avidity. Převzato z Arslan et al. (2023)

9.2. Sekvence DNA jedinců ze souboru COPAT

Soubor 98 námi vytipovaných jedinců byl součástí rozsáhlejšího souboru získaného v rámci projektu COPAT, byla pro sekvenaci takto velkého souboru již dříve zvolena odlišná technologie. Knihovny byly připraveny pomocí přístroje Juno a s využitím technologie Integrated Fluidic Circuits. Tato technologie pracuje s velice malými objemy vzorků vstupní DNA i nezbytných reagensů, proto byla v tomto případě zvolena jako nejekonomičtější pro zpracování velkého množství vzorků vstupní DNA. Proces přípravy knihoven probíhá automatizovaně vložením destičky, která v označených jamkách obsahuje vzorky DNA se specifickými barkodovými kódy a reagentie potřebné pro proběhnutí reakcí, do zařízení Juno. Přístroj pomocí mikrofluidiky přenáší nanolitrová množství vzorků DNA a reagensů do reakčních mikrocel a působením teplotních cyklů probíhá amplifikace cílové DNA principem PCR. Takto je možno na každé destičce současně připravit 192 DNA knihoven. Po proběhnutí cyklu jsou získané knihovny sesbírány do jedné 1,5 ml zkumavky a přečištěny magnetickými kuličkami. Po provedení kontroly kvality jsou knihovny odeslány na sekvenaci. Sekvence byla provedena pomocí přístroje NextSeq 500 (Illumina, USA) v Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky.

10 Zpracování dat

Výstupem ze sekvenátoru je FASTQ soubor se záznamem sekvenačních dat. U tohoto souboru byla provedena komplexní bioinformatická analýza. Proběhla kontrola kvality sekvenace a zarovnání přečtených sekvencí k referenčnímu genomu GRCh38 (hg38). Zarovnání sekvencí k referenčnímu genomu umožňuje následnou analýzu variací ve studovaném genomu srovnáváním se sekvencí referenčního genomu. Analýza genetických variací probíhá pomocí tzv. variant calling (volání variant), při kterém jsou detekovány odchylky (varianty) ve studované DNA od referenčního genomu.

Pro vyhodnocení sekvenačních dat byla využita platforma Franklin (Genoox, USA), která umožňuje detekci a klasifikaci genetických variant, jako jsou jednonukleotidové polymorfismy a inserce a delece nukleotidů. Platforma pomocí variant calling detekuje varianty ve studované DNA a s využitím algoritmů, umělé inteligence a propojení s existujícími databázemi a predikčními programy vybere varianty, které jsou potenciálně klinicky významné. Protože naším cílem bylo hledání variant v genech spojovaných především s monogenní obezitou, sestavili jsme na základě literatury panel genů, které byly v platformě Franklin označeny jako prioritní. Tento panel zahrnoval 18 genů: *AGRP*, *BDNF*, *CARTPT*, *GNAS*, *KCNJ13*, *LEP*, *LEPR*, *MC3R*, *MC4R*, *NME7*, *NPY*, *NTRK2*, *PCSK1*, *POMC*, *PTEN*, *SH2B1*, *SHBG*, *SIMI*. Přehled základních funkcí panelu genů je uveden v tabulce 8. Nalezené potenciálně klinicky významné varianty v těchto genech byly následně dohledávány v dostupné literatuře a selektovány pro další analýzu.

Tab. 8: Přehled genů vybraných v rámci panelu genů a jejich základní charakteristika.
Vytvořeno dle (Rankinen et al., 2006).

Gen	Celý název	Základní charakteristika
<i>AGRP</i>	Agouti Related Neuropeptide	Kóduje antagonistu receptoru melanokortinu-3 a melanokortinu-4. Reguluje hypotalamickou kontrolu příjmu potravy a hraje roli v homeostáze hmotnosti. Mutace jsou spojeny s pozdním nástupem obezity.
<i>BDNF</i>	Brain Derived Neurotrophic Factor	Kóduje protein z rodiny nervových růstových faktorů. Může hrát roli v regulaci stresové reakce a biologii poruch nálady.
<i>CARTPT</i>	CART Prepropeptide	Kóduje preproprotein zpracovávaný na biologicky aktivní peptidy, které ovlivňují chuť k jídlu, energetickou bilanci a reakci na stres. Mutace jsou spojeny s náchylností k obezitě.
<i>GNAS</i>	GNAS Complex Locus	Kóduje stimulační alfa podjednotku G-proteinu (<i>Gαs</i>). Mutace způsobují obezitu a hormonální rezistenci (pseudohypoparatyreóza) a další syndromy.
<i>KCNJ13</i>	Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 13	Kóduje protein tvořící iontový kanál. Mutace mohou být spojeny s pozdním nástupem obezity.
<i>LEP</i>	Leptin	Kóduje protein leptin, který je vylučován bílými adipocyty. Reguluje energetickou homeostázu. Mutace vedou k těžké obezitě, morbidní obezitě a T2DM.
<i>LEPR</i>	Leptin Receptor	Kóduje protein, který je receptorem pro leptin a podílí se na regulaci metabolismu tuků. Mutace jsou spojovány s obezitou a dysfunkcí hypofýzy.
<i>MC3R</i>	Melanocortin 3 Receptor	Kóduje receptor pro melanocyty stimulující hormon a adrenokortikotropní hormon. Mutace jsou spojeny s náchylností k obezitě.
<i>MC4R</i>	Melanocortin 4 Receptor	Kóduje protein pro membránově vázaný receptor, který je členem rodiny melanokortinových receptorů. Defekty <i>MC4R</i> spojeny s autozomálně dominantní obezitou.
<i>NME7</i>	Nucleoside Diphosphate Kinase 7	Zapojen do biogeneze nebo funkce řasinek. Protože obezita a diabetes jsou běžné u několika ciliopatií, má <i>NME7</i> potenciál pro výzkum těchto onemocnění.

<i>NPY</i>	Neuropeptide Y	Kóduje neuropeptid ovlivňující příjem potravy, stres, cirkadiální rytmy a další procesy. Polymorfismus v tomto genu vedoucí ke změně leucinu 7 na prolin v signálním peptidu je spojen se zvýšenou hladinou cholesterolu, s metabolickými a kardiovaskulárními riziky.
<i>NTRK2</i>	Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 2	Kóduje člena rodiny neurotrofických tyrosinových receptorových kináz. Mutace jsou spojeny s obezitou a poruchami nálady.
<i>PCSK1</i>	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1	Kóduje enzym zpracovávající proproteiny. Mutace jsou spojeny s obezitou a deficitem proprotein konvertázy 1/3.
<i>POMC</i>	Proopiomelanocortin	Kóduje preproprotein poskytující biologicky aktivní peptidy regulující chuť k jídlu, pigmentaci a další funkce. Mutace vedou k časnému nástupu obezity.
<i>PTEN</i>	Phosphatase and Tensin Homolog	Nádorový supresor. Mutace ovlivňují růst buněk, glukózovou homeostázu a jsou spojeny s obezitou i rakovinou.
<i>SH2B1</i>	SH2B Adaptor Protein 1	Zvyšuje leptinovou a podporuje inzulínovou signalizaci. Mutace jsou spojeny s leptinovou rezistencí, inzulínovou rezistencí a T2DM.
<i>SHBG</i>	Sex Hormone Binding Globulin	Kóduje protein vázající steroidy. Hladiny <i>SHBG</i> klesají s obezitou. Polymorfismy jsou spojeny se syndromem polycystických ovaríí a T2DM.
<i>SIM1</i>	SIM bHLH Transcription Factor 1	Haploinsuficience způsobuje hyperfagickou obezitu a vývojové abnormality mozku. Role u obezity není zcela prokázána.

11 Výsledky – longitudinální studie

Celkem bylo v souboru 96 vzorků DNA pacientů s podezřením na monogenní obezitu vytipováno 14 potenciálně klinicky významných genetických variant asociovaných s polygenní obezitou. Varianty byly vybírány na základě toho, že byly v databázi ClinVar označeny jako potenciálně patogenní, vykazovaly nekonzistentní interpretace patogenicity, nebo se jednalo o varianty neurčitěho účinku. V případě nepopsaných variant bylo o zařazení do souboru rozhodnuto na základě toho, že predikčních in silico nástroje variantu označily jako potenciálně patogenní.

Nalezené varianty se vyskytovaly v 9 genech. Identifikována byla jedna nepopsaná potenciálně patogenní varianta NME7 c.238G>T.

Konkrétně byly nalezeny tyto varianty: AGRP c.199G>A, GNAS c.565_568del, LEPR c.2171T>C, LEPR c.2260G>A, MC4R c.105C>A, MC4R c.110A>T, NME7 c.238G>T, PCSK1 c.375G>A, PCSK1 c.661A>G, PCSK1 c.1918A>G, POMC c.280_297dup, POMC c.394C>G, POMC c.641A>G, SH2B1 c.524C>A.

Přítomnost vytipovaných variant byla zjištěna u 7 z celkem 40 osob se zvýšeným rizikem obezity. Ze 14 vytipovaných variant byly v souboru osob se zvýšeným rizikem obezity nalezeny celkem 4 varianty. Jednalo se o varianty AGRP c.199G>A, PCSK1 c.661A>G, POMC c.394C>G, POMC c.641A>G. Polymorfismus AGRP c.199G>A byl nalezen u 2 osob, z rizikové skupiny, PCSK1 c.661A>G u 3 osob, POMC c.394C>G u 1 osoby a POMC c.641A>G také u 1 osoby. Všechny tyto varianty byly již dříve popsány v literatuře.

Na druhou stranu, přítomnost vytipovaných variant byla zjištěna také u osob ze souboru nerizikových jedinců. Varianty byly nalezeny u 9 osob z celkového souboru 58 jedinců. Polymorfismus AGRP c.199G>A byl nalezen u 3 osob ze souboru nerizikových jedinců, PCSK1 c.661A>G taktéž u 3 osob, POMC c.394C>G u 1 osoby a POMC c.641A>G u 2 osob. Frekvenci vytipovaných alel u rizikové a nerizikové skupiny zobrazuje tabulka 9.

Frekvence nalezených variant se u rizikové a nerizikové skupiny signifikantně neliší.

Tab. 9: Frekvenční zastoupení vytipovaných alel u rizikové a nerizikové skupiny

	Riziková skupina	Neriziková skupina	
Varianta	Frekvence	Frekvence	p-value*
AGRP c.199G>A	5,0%	5,2%	1.0
PCSK1 c.661A>G	7,5%	5,2%	0.686
POMC c.394C>G	2,5%	1,7%	1.0

* Fisherův exaktní test

12 Diskuze

Obezita je komplexní multifaktoriální onemocnění, které představuje jeden z největších zdravotních problémů současnosti. Navzdory dlouhodobému a intenzivnímu výzkumu příčin a mechanismů vedoucích k rozvoji nadměrné tělesné hmotnosti, zůstávají některé aspekty tohoto onemocnění stále neobjasněné. Prevalence nadváhy a obezity celosvětově stále narůstá. Podle WHO v roce 2022 nadváhou a obezitou celosvětově trpělo 390 milionů dětí a adolescentů (URL1). Nadměrná hmotnost může být v dětském věku spojena s řadou metabolických komplikací, jako je diabetes mellitus 2. typu, hypertenze a dyslipidémie (Kumar & Kelly, 2017; V. Sharma et al., 2019). Většina obézních dětí zůstává obézních i v dospělosti, což se pojí s dalšími zdravotními riziky (Simmonds et al., 2016).

Komplexní mechanismy rozvoje polygenní obezity vyplývají z interakce mezi vnějším prostředím, genetickou predispozicí a lidským chováním. Rizikové faktory vnějšího prostředí jsou poměrně dobře známé. V současné době je hlavní příčinou nadměrné hmotnosti většiny dětí a adolescentů pozitivní energetická bilance, která je důsledkem nevhodných stravovacích návyků a nedostatečné fyzické aktivity (Lee & Yoon, 2018). S pokrokem molekulárně-genetických technik nastal rozmach studia také genetického pozadí patogeneze polygenní obezity. To je však v případě takto komplexního multifaktoriálního onemocnění velmi obtížné. I přes značné vynaložené úsilí a odhalení více než tisíce kandidátních variant, které mohou mít vliv na vznik a rozvoj nadměrné hmotnosti, lze popsány variantami v současné době vysvětlit pouze 5–6 % interindividuální variability v náchylnosti k tomuto onemocnění (Trang & Grant, 2023).

Diplomová práce komplexní charakter rozvoje obezity reflektuje a věnuje se jak problematice faktorů vnějšího prostředí, tak faktorů genetických.

V první části práce, kterou představuje průřezová studie 1947 českých adolescentů, byl hodnocen vliv sportovní aktivity na vybrané antropometrické a biochemické parametry. Data o sportovní aktivitě byla od jedinců získána na základě dotazníkového šetření. Dotazníky o sportovní aktivitě byly vyplněny zákonnými zástupci probandů. Protože se jednalo o nestandardizovaný dotazník, bylo součástí práce také navržení přístupu pro vyhodnocení získaných dotazníkových dat. Cílem vyhodnocení dat bylo jedince roztrždit do kategorií na základě toho, kolik hodin týdně tráví sportovní aktivitou nad rámec školní tělesné výchovy. Jako efektivní způsob vyhodnocení dat bylo navrženo udělovat jedincům na základě jejich

dosažené sportovní aktivity skóre, podle nějž byli následně rozděleni do 4 skupin. První skupina zahrnovala nejméně aktivní jedince, čtvrtá skupina jedince nejvíce aktivní. Hodnocený soubor zahrnoval celkem 892 chlapců a 1055 dívek. Vliv sportovní aktivity na antropometrické a biochemické parametry byl u obou pohlaví hodnocen zvlášť.

Analýzou vztahu antropometrických parametrů a skóre sportovní aktivity bylo zjištěno, že chlapci, kteří dosahovali nejvyššího skóre sportovní aktivity, měli v porovnání s chlapci s nejnižším skóre, signifikantně nižší SDS BMI, WHtR, procento celkového tělesného tuku a signifikantně vyšší procento tukuprosté hmoty v těle. V případě dívek nebyl efekt sportovní aktivity na sledované antropometrické parametry tak výrazný jako u chlapců, nicméně stále platilo, že SDS BMI a WHtR dívek skupiny s nejvyšším skóre sportovní aktivity bylo signifikantně nižší a procento tukuprosté hmoty signifikantně vyšší než u dívek, které dosahovaly nejnižšího skóre sportovní aktivity. Procento tělesného tuku se u dívek napříč skupinami signifikantně nelišilo. Tato zjištění jsou ve shodě s výsledky italské studie autorů Morelli et al. (2020), kteří u svého souboru adolescentů ve věku 14–17 let taktéž zjistili pohlavně specifický vliv sportovní aktivity na antropometrické parametry u chlapců a dívek. Zatímco u chlapců byl pozorován statisticky významný vliv sportovní aktivity na hodnoty BMI, procento celkového tuku v těle i procento tukuprosté hmoty, u dívek se vliv sportovní aktivity signifikantně projevil pouze na BMI (Morelli et al., 2020). Starší longitudinální kanadská studie autorů Baxter-Jones et al. (2008), která u dětí a adolescentů ve věku 8–15 let po dobu 6 let sledovala množství tukuprosté hmoty v těle, také zjistila velmi výrazné rozdíly mezi chlapci a dívkami. Přestože signifikantní efekt sportovní aktivity na množství tukuprosté hmoty v těle byl významný jak u chlapců, tak i u dívek, chlapci, kteří dosahovali stejné úrovně sportovní aktivity jako dívky, měli až o 120 % více celkové tukuprosté hmoty v těle ve srovnání se stejně aktivními dívkami (Baxter-Jones et al., 2008).

Pohlavní rozdíly byly v naší studii zaznamenány také v případě vztahu sportovní aktivity a biochemických parametrů. Chlapci s nejvyšším skóre sportovní aktivity měli v porovnání s chlapci s nejnižším skóre sportovní aktivity signifikantně: nižší hladiny triacylglycerolů v séru, vyšší hladiny HDL-cholesterolu v séru, nižší hodnoty indexů HOMA-R a HOMA-F a nižší hodnotu diastolického tlaku. U dívek z neaktivnější skupiny byly v porovnání s dívkami z nejméně aktivní skupiny zjištěny signifikantně vyšší hladiny HDL-cholesterolu a signifikantně nižší hladiny LDL-cholesterolu. U chlapců ani u dívek pak nebyly statisticky významné rozdíly mezi neaktivnějšími a nejméně aktivními jedinci zaznamenány v případě hodnot glykémie na lačno a hodnot systolického krevního tlaku. Vlivem sportovní aktivity

na biochemické parametry se také zabývala již výše zmiňovaná italská studie autorů Morelli et al. (2020). Ta shodně s našimi výsledky zaznamenala signifikantně nižší hodnotu indexu HOMA-R u chlapců z neaktivnější skupiny v porovnání s chlapci z nejméně aktivní skupiny a stejně jako v naší studii, ani zde nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl v hodnotách glykémie na lačno u chlapců i u dívek napříč skupinami. Na rozdíl od nás však v italské studii překvapivě zjistili u chlapců z nejméně aktivní skupiny signifikantně vyšší hladiny HDL-cholesterolu v porovnání s chlapci z neaktivnější skupiny. Vliv sportovní aktivity na hladiny triacylglycerolů v séru nebyl u chlapců, na rozdíl od naší studie, v italské studii signifikantní. Další rozdíl představuje fakt, že italská studie zjistila u nejméně aktivních dívek signifikantně nižší hladiny LDL-cholesterolu ve srovnání s dívkami, které dosahovaly nejvyšších hodnot sportovní aktivity. Stejně jako v naší studii pak nebyl u dívek zjištěn signifikantní vliv sportovní aktivity na hladiny triacylglycerolů v séru (Morelli et al., 2020). Vysvětlením italské i kanadské studie pro takto výrazné pohlavní rozdíly mezi chlapci a dívkami je rozdílný hormonální profil chlapců a dívek, vyšší množství svalové hmoty u chlapců nebo celková rozdílná adaptace obou pohlaví na vykonávanou aktivitu (Baxter-Jones et al., 2008; Morelli et al., 2020).

Italská i kanadská studie stejně jako tato práce vycházely z dotazníkových dat poskytovaných samotnými účastníky nebo jejich zákonnými zástupci. Tento způsob sběru dat je v případě epidemiologických studií s velkými počty účastníků naprosto adekvátní, nicméně někteří autoři upozorňují na značné rozdíly mezi aktivitou, kterou jedinci sami udávají a aktivitou, která je u těchto jedinců objektivně změřena (např. akcelerometrem) (Andersen, 2009; Sallis & Saelens, 2000). Bylo zjištěno, že děti a adolescenti svou aktivitu nadhodnocují zvláště v případě, kdy mají udávat množství vykonané intenzivní fyzické aktivity. Naopak v případě středně intenzivní aktivity dosahují jedinci při objektivním měření vyšších hodnot aktivit, než sami udávají (Andersen, 2009; Pate et al., 2002). Autoři Pate et al. (2002) navrhují jako vhodné a logisticky proveditelné řešení, které odráží skutečnou fyzickou aktivitu, alespoň týdenní měření aktivity pomocí akcelerometru (Pate et al., 2002). Pro celostátní epidemiologické studie, jakou byl i projekt COPAT, však dotazníkové šetření stále představuje nejdostupnější možnost sběru dat o vykonané sportovní aktivitě.

Unikátní data o vztahu sportovní aktivity a antropometrických a biochemických parametrů poskytují intervenční studie. Například v jihoafrické intervenční studii autoři Grace et al. (2021) u adolescentů s nadváhou a obezitou ve věku 13–16 let sledovali proměny v antropometrických a biochemických parametrech po desetitýdenní intervenci. Intervence zahrnovala aerobní a odporová cvičení pod dohledem i samostatně, spolu s nutriční osvětou. Po deseti týdnech bylo

u probandů pozorováno statisticky signifikantní snížení BMI, systolického krevního tlaku a LDL-cholesterolu. U hodnot diastolického krevního tlaku, triacylglycerolů, HDL-cholesterolu, glykémie a indexu HOMA-R nebyla pozorována statisticky signifikantní změna. Ve studii nebyli chlapci a dívky hodnoceni zvlášť, nicméně celkový obraz o vztahu sportovní aktivity (spolu s nutriční edukací) a antropometrických a biochemických parametrů poskytuje (Grace et al., 2021).

Výsledky získané naší studií i dalšími studiemi svědčí o pozitivním vlivu sportovní aktivity na některé antropometrické a metabolické parametry u chlapců i u dívek v adolescentním věku, nicméně s jistými pohlavně specifickými rozdíly. Role fyzické aktivity je v dětství a adolescenci vyzdvihována také díky pozitivnímu efektu na rozvoj kostní tkáně (Baxter-Jones et al., 2008), na psychické zdraví jedinců nebo celkově jako prevence rozvoje chronických onemocnění (Brown et al., 2024). Proto jsou poměrně alarmující zjištění nedávné studie autorů Salonna et al. (2023), kteří u českých adolescentů sledovali dodržování celosvětových doporučení vydaných WHO k pohybové aktivitě. Světová zdravotnická organizace doporučuje u dětí a adolescentů alespoň 60 minut středně intenzivní až intenzivní pohybové aktivity denně. Bylo zjištěno, že pouze 20,6 % českých chlapců a 15,8 % dívek ve věku 11–15 let denně dosáhne doporučovaných hodnot pohybové aktivity. Období adolescence v tomto ohledu představuje kritický věk, protože zatímco v 11 letech alespoň 23,9 % českých adolescentů vykoná nejméně hodinu pohybové aktivity denně, v 15 letech už je to jen 8,4 % (Salonna et al., 2023).

Silné stránky naší studie spatřuji v početném vzorku zapojených adolescentů v rámci epidemiologické i intervenční studie. Vzhledem k tomu, že dotazník sportovní aktivity byl sestaven tak, aby zjišťoval celoroční sportovní aktivitu, nebyla získaná data od jedinců zapojených do intervenční studie zkreslena aktuálně probíhajícím intervenčním programem. Limitací studie je dotazníkový sebereportovací (v tomto případě vyplňován zákonnými zástupci) sběr dat, při kterém může docházet k nadhodnocování i podhodnocování udávaných hodnot, nicméně pro studii tohoto rozměru se jedná o adekvátní způsob sběru dat. Výsledky naší studie zdůrazňují důležitost zapojení adolescentů do sportovních aktivit jako možného způsobu pro zvýšení aktuální i budoucí kvality života.

Druhá část průřezové studie zjišťovala asociace polymorfismu rs686989 (G/A) v genu *ZBTB16* s vybranými antropometrickými a biochemickými parametry taktéž u souboru adolescentů z projektu COPAT. Polymorfismus tohoto genu byl pro studii vybrán na základě předchozí

práce autorů Bendlová et al. (2017), kteří ve své studii vycházeli ze studií provedených na animálních modelech (Šeda et al., 2017), ve kterých byla zjištěna souvislost genu *ZBTB16* a parametrů metabolického syndromu. Autoři Bendlová et al. (2017), ve své studii testovali vliv polymorfismů genu *ZBTB16* na některé antropometrické parametry a parametry lipidového spektra u dospělých osob (Bendlová et al., 2017). Na základě výpočtu OR (poměru šancí) jsme v naší studii potvrdili, že přítomnost minoritní alely A polymorfismu rs686989 v genotypu navyšuje šanci na přítomnost obezity (OR = 1,37 (1,12–1,68)). Jako statisticky významný a nejvýhodnější model byl určen dominantní model, tedy model, kdy v heterozygotním stavu účinek jedné alely (minoritní alely A) dominuje nad účinkem druhé alely (majoritní alely G). Pro další analýzu byly proto skupiny minoritních homozygotů a heterozygotů spojeny do skupiny AG/AA a analyzovány oproti skupině majoritních homozygotů GG.

Asociační analýzou polymorfismu rs686989 v genu *ZBTB16* s vybranými antropometrickými a biochemickými parametry nebyla u chlapců zjištěna žádná statisticky významná asociace mezi genotypy AG/AA a jakýmkoliv ze sledovaných znaků. U dívek se přítomnost minoritní alely A pojila se statisticky významně: vyššími hodnotami SDS BMI, vyšším WHtR, vyšším procentem tělesného tuku, nižším procentem tukuprosté hmoty, nižšími hodnotami glykémie na lačno a vyššími hodnotami indexu HOMA-F. Dosud nebyla publikována žádná studie, která by se polymorfismem rs686989 v genu *ZBTB16* u adolescentů zabývala. Ve výše zmiňované práci autorů Bendlová et al. (2017), ve které byla asociační studie provedena u dospělých osob, byla přítomnost minoritní alely A polymorfismu rs686989 v genu *ZBTB16* po adjustaci na věk u mužů i u žen spojena se signifikantně vyšším BMI, WHR, WHtR, indexem tělesné adipozity, obvodem pasu a obvodem břicha a dále s vyšším celkovým cholesterolem a LDL-cholesterolem. U mužů byl u daných parametrů potvrzen také efekt dalších třech polymorfismů v genu *ZBTB16*: rs567057, rs661223, rs675044. Vztah genu *ZBTB16* a antropometrických a biochemických parametrů u dospělých byl studován také v mexické studii autorů (Velazquez-Roman et al., 2023), ve které byl pro analýzu vybrán jiný polymorfismus genu *ZBTB16*, polymorfismus rs7106340 (G/T). Ve studii nebyl efekt polymorfismu hodnocen zvlášť pro muže a pro ženy a asociace tak byla pro obě pohlaví provedena společně. Efekt polymorfismu nebyl v mexické studii u žádného ze sledovaných parametrů (BMI, hmotnost, obvod pasu, WHR, celkový cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triacylglyceroly, glykémie, systolický a diastolický tlak) signifikantní (Velazquez-Roman et al., 2023).

Výsledky této diplomové práce i studie autorů Bendlová et al. (2017) naznačují, že polymorfismy v genu *ZBTB16* pravděpodobně mají určitý efekt na antropometrické

a biochemické parametry, i když tento efekt je velmi jemný. Z tohoto důvodu by v budoucích studiích bylo vhodné pracovat s velkými kohortami jedinců, ve kterých je vyšší šance detekovat i polymorfismy malého účinku (Bendlová et al., 2017; Velazquez-Roman et al., 2023). Další možností rozdílných výsledků mezi studiemi může být modulace efektu polymorfismů genu *ZBTB16* různým genomickým pozadím nebo podmínkami prostředí (Šeda et al., 2017). Jak již bylo popsáno v literárním úvodu, ZBTB16 je transkripční faktor, který se podílí na řadě biologických procesů. Z tohoto důvodu je jeho exprese přísně regulována mnoha faktory, mezi něž patří také hormony jako glukokortikoidy (Chen et al., 2014) a progesteron (Fahrenstich et al., 2003). Tato hormonální regulace exprese by mohla být vysvětlením značných mezipohlavních rozdílů (Bendlová et al., 2017). Zajímavým je v tomto ohledu také fakt, že v případě diplomové práce byl efekt minoritní alely v adolescenci patrnější u dívek, zatímco v práci autorů Bendlová et al. (2017) byl v dospělosti efekt na sledované parametry patrnější u mužů.

Na tomto místě je potřeba zdůraznit, že veškeré biochemické parametry studovaného souboru adolescentů byly v normě. Nicméně zhoršené parametry jak u jedinců z nejméně aktivní skupiny, tak u nositelů minoritní alely A jsou stále významným výsledkem.

Longitudinální studie se taktéž věnovala genetickému pozadí obezity, avšak s využitím rozdílného přístupu. V této části práce bylo s využitím metod NGS provedeno celoexomové sekvenování DNA 96 pacientů s podezřením na monogenní obezitu. Využití NGS umožňuje současnou identifikaci běžných i vzácných variant genů. Tento přístup se již dříve osvědčil v identifikaci mutací v genech způsobujících monogenní onemocnění (Boycott et al., 2013). V současnosti je stále častěji využíván také ve výzkumu komplexních onemocnění (Nordang et al., 2017). Exom souboru pacientů sloužil pro detekci potenciálně klinicky významných variant v předem sestaveném panelu genů, který zahrnoval geny: *AGRP*, *BDNF*, *CARTPT*, *GNAS*, *KCNJ13*, *LEP*, *LEPR*, *MC3R*, *MC4R*, *NME7*, *NPY*, *NTRK2*, *PCSK1*, *POMC*, *PTEN*, *SH2B1*, *SHBG*, *SIMI*. Tyto geny byly vybrány na základě literatury jako geny, které mají význam především v rozvoji monogenní obezity, ale také některých syndromů. Celkem bylo nalezeno 14 potenciálně klinicky významných variant v 9 genech: *AGRP*, *GNAS*, *LEPR*, *MC3R*, *MC4R*, *NME7*, *PCSK1*, *POMC*, *SH2B1*. V těchto 14 variantách byla identifikována 1 nová varianta, která nebyla popsána v literatuře a zároveň byla in silico modely označena jako potenciálně patogenní. Jedná se o variantu *NME7*(NM_013330.5):c.238G>T. Zbýlých 13 variant bylo již dříve v literatuře popsáno a jedná se o varianty, které byly v rámci databáze ClinVar označeny

jako potenciálně patogenní, vykazovaly nekonzistentní interpretace patogenicity, nebo se jednalo o varianty neurčitěho účinku.

Cílem longitudinální studie bylo zjistit frekvenci takto vytipovaných variant u jedinců ze souboru COPAT, kteří byli zařazeni do tzv. skupiny osob se zvýšeným rizikem obezity. Skupina byla vytvořena na základě dat o tělesné výšce a tělesné hmotnosti získaných v rámci preventivních prohlídek u praktického lékaře pro děti a dorost v průběhu 1–15 let věku zapojených probandů. Za jedince se zvýšeným rizikem obezity byli považováni ti, jejichž SDS BMI se alespoň při pěti preventivních prohlídkách pohybovalo nad 50. percentilem a současně jejich BMI v rané dospělosti (20–25 let) odpovídalo nadváze nebo obezitě. Výsledný soubor tvořilo celkem 40 osob se zvýšeným rizikem obezity. Ze 14 vytipovaných variant byly v souboru osob se zvýšeným rizikem obezity nalezeny celkem 4 varianty a přítomnost těchto variant byla zjištěna celkem u 7 osob. Na druhou stranu, přítomnost vytipovaných variant byla zjištěna také u osob z kontrolního souboru, tedy osob nerizikových. Varianty byly nalezeny u 9 osob z celkového souboru 58 nerizikových jedinců. Nalezeny byly 4 varianty, které byly stejné jako u souboru osob se zvýšeným rizikem. Frekvence nalezených vytipovaných alel se mezi soubory rizikových a nerizikových jedinců signifikantně nelišily. Všichni nositelé nalezených variant byli pro danou variantu heterozygoti.

Jednalo se o varianty:

AGRP(NM_001138.2):c.199G>A u 2 osob z rizikové a 3 osob z nerizikové skupiny,

PCSK1(NM_000439.5):c.661A>G u 3 osob z rizikové a u 3 osob z nerizikové skupiny,

POMC(NM_001319205.2):c.394C>G u 1 osoby z rizikové a 1 osoby z nerizikové skupiny,

POMC(NM_001319205.2):c.641A>G u 1 osoby z rizikové a 2 osob z nerizikové skupiny.

Studii s podobnou metodologií a překrývajícím se panelem studovaných genů provedli norští autoři Nordang et al. (2017), kteří u 485 pacientů s morbidní obezitou a 327 kontrol provedli sekvenaci exonů genů *LEP*, *LEPR*, *MC4R*, *PCSK1* a *POMC*. Tímto způsobem se jim podařilo v souboru detekovat celkem 151 variant, z nichž 28 variant bylo vzácných. Frekvence detekovaných vzácných variant byla signifikantně vyšší u pacientů s morbidní obezitou než u kontrol (Nordang et al., 2017). V portugalské studii autorů Manco et al. (2023) byly NGS metody využity pro sekvenaci exonů 12 genů spojených s monogenní obezitou: *LEP*, *LEPR*, *MC4R*, *POMC*, *PCSK1*, *BDNF*, *NTRK2*, *SIMI*, *SH2B1*, *UCP3*, *GCG* a *ADCY3*. Sekvenace byla

provedena u osob s nadváhou, obezitou 1. stupně a obezitou 2. stupně. V tomto souboru bylo nalezeno celkem 22 různých vzácných variant ve všech 12 genech a frekvence variant se u osob s nadváhou, obezitou 1. stupně a obezitou 2. stupně signifikantně nelišila. Kromě vzácných variant bylo nalezeno také dalších 157 variant s potenciálním klinickým významem. Ani frekvence těchto variant se u žádné ze tří sledovaných skupin signifikantně nelišila (Manco et al., 2023).

Důvodů pro nekonzistentnost výsledků diplomové práce, norské studie i portugalské studie může být více. V norské studii autorů Nordang et al. (2017) byla sice frekvence nalezených variant signifikantně vyšší u obézních osob než u kontrol, jednalo se ale o osoby morbidně obézní, tedy poměrně specifickou kohortu (medián BMI souboru byl 44 kg/m²). Navíc byla v norské studii, na rozdíl od diplomové práce, sledována frekvence pouze vzácných variant v genech spojených s monogenní obezitou (Nordang et al., 2017). V portugalské studii autorů Manco et al. (2023) byla kromě frekvence vzácných variant sledována také frekvence všech potenciálně klinicky významných variant, která se, stejně jako v diplomové práci, napříč sledovanými skupinami signifikantně nelišila. V portugalské studii však, na rozdíl od diplomové práce, nebyla sledována frekvence variant u normostenických jedinců. Z těchto důvodů není možné výsledky získané v rámci diplomové práce se zahraničními studii dále srovnávat.

Nesignifikantní rozdíly ve frekvenci vytipovaných variant mezi rizikovou a nerizikovou skupinou v souboru longitudinální studie mohou být způsobeny mnoha faktory. Například zvolená metodika pro rozdělení jedinců na rizikové (SDS BMI v dětství > 50. percentil) a nerizikové nemusela být dostatečně efektivní ve vytipování skutečných rizikových osob, protože kritéria pro zařazení do skupiny byla příliš mírná. Dalším faktorem, který mohl výsledky ovlivnit, je velikost studovaného souboru. V neposlední řadě pak mohly hrát roli samy vytipované varianty.

Varianta *AGRP*(NM_001138.2):c.199G>A je v databázi ClinVar evidována jako benigní, nicméně bylo zjištěno, že tento polymorfismus vede k nekonzervativní náhradě aminokyseliny alaninu za threonin na pozici 67, což zřejmě vede ke změně konformace proteinu a možnému ovlivnění jeho funkce. Efekt varianty byl testován na souboru rodičů a jejich potomků. V případě potomků nebyla přítomnost polymorfismu c.199G>A spojena se signifikantně vyššími hodnotami BMI, tukové hmoty, procenta tělesného tuku ani viscerálním tukem, avšak u rodičů (průměrný věk 53 let) s přítomným polymorfismem c.199G>A byly všechny čtyři

parametry signifikantně vyšší (Argyropoulos et al., 2002). Tato zjištění naznačují, že by polymorfismus c.199G>A v rozvoji obezity mohl hrát roli, ale jeho vliv se zřejmě může měnit s věkem.

Varianta *PCSK1*(NM_000439.5):c.661A>G je v databázi ClinVar taktéž evidována jako benigní. Způsobuje záměnu aminokyseliny asparaginu za serin na pozici 221. Pro analýzu v diplomové práci byla vybrána na základě studie autorů Benzinou et al. (2008), kteří asociační analýzou na kohortách dětí i dospělých zjistili asociaci mezi přítomností polymorfismu c.661A>G a obezitou (Benzinou et al., 2008).

Varianta *POMC*(NM_001319205.2):c.394C>G je v databázi ClinVar evidována jako varianta s nejistým významem. Přítomnost varianty vede k záměně aminokyseliny prolinu za alanin na pozici 132. Funkční in vitro studie naznačují, že tato záměna může vést ke zvýšení funkce proteinu (Shah et al., 2023). Varianta c.394C>G byla detekována jak u jedinců trpících obezitou (Kleinendorst et al., 2018; Nordang et al., 2017; Shah et al., 2023), tak i u kontrol (Nordang et al., 2017).

Varianta *POMC*(NM_001319205.2):c.641A>G je v databázi ClinVar evidována jako varianta s nejistým významem/pravděpodobně benigní, protože byla detekována jak u osob s obezitou (Hinney et al., 1998), tak u kontrol (Hinney et al., 1998; Kleinendorst et al., 2018; Pankov et al., 2002). Způsobuje záměnu aminokyseliny kyseliny glutamové za glycin na pozici 188. Pomocí in silico analýz bylo odhadnuto, že tato záměna by mohla mít deleční efekt na strukturu proteinu.

Tento přehled variant identifikovaných v souboru rizikových i nerizikových jedinců odráží rozpory, s jakými se výzkum polymorfismů souvisejících s polygenní obezitou musí potýkat. Budoucnost identifikace vzácných variant i běžných variant malého účinku představují rozsáhlé populační studie.

13 Závěr

Obezita je komplexní multifaktoriální onemocnění, které představuje jeden z největších zdravotních problémů současnosti. Prevalence nadváhy a obezity celosvětově stále narůstá. Komplexní mechanismy rozvoje polygenní obezity vyplývají z interakce mezi vnějším prostředím, genetickou predispozicí a lidským chováním. Rizikové faktory vnějšího prostředí jsou poměrně dobře známé. V současné době je hlavní příčinou nadměrné hmotnosti většiny dětí a adolescentů pozitivní energetická bilance, která je důsledkem nevhodných stravovacích návyků a nedostatečné fyzické aktivity. S pokrokem molekulárně-genetických technik nastal rozmach studia také genetického pozadí patogeneze polygenní obezity. To je však v případě takto komplexního multifaktoriálního onemocnění velmi obtížné.

Diplomová práce komplexní charakter rozvoje obezity reflektuje a věnuje se jak problematice faktorů vnějšího prostředí, tak faktorů genetických.

První část práce tvořila průřezová studie 1947 českých adolescentů, u kterých byla provedena asociační studie zjišťující efekt sportovní aktivity na tělesné složení a metabolické zdraví. Hodnocen byl také vliv polymorfismu rs686989 v genu *ZBTB16* na vybrané antropometrické a biochemické parametry související s nadváhou a obezitou. Získané výsledky vypovídají o pozitivním vlivu sportovní aktivity na některé antropometrické a metabolické parametry u chlapců i u dívek v adolescentním věku, nicméně s jistými pohlavně specifickými rozdíly. Asociační studií polymorfismu rs686989 v genu *ZBTB16* s vybranými antropometrickými a biochemickými parametry byl zjištěn určitý efekt tohoto polymorfismu, který je však zřejmě velmi jemný.

Druhou část práce tvořila longitudinální studie, ve které bylo využito technik masivního paralelního sekvenování exomu u pacientů s podezřením na monogenní obezitu za účelem vytipování potenciálně klinicky významných variant ve vybraném panelu genů. Frekvence vytipovaných variant byla následně zjišťována u osob se zvýšeným rizikem obezity a kontrol. Přestože nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly ve frekvenci identifikovaných variant mezi rizikovou a nerizikovou skupinou, v diplomové práci byl ilustrován moderní přístup výzkumu polygenní obezity opírající se o bioinformatickou analýzu.

Rozšíření poznatků o genech podmiňujících náchylnost k obezitě a také o tom, jak jsou tyto geny modulovány faktory životního stylu by mohlo v budoucnu výrazně zefektivnit prevenci, diagnostiku i léčbu polygenní obezity.

14 Seznam použité literatury

ABARCA-GÓMEZ, Leandra, et al. 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. *The lancet*, 2017, 390.10113: 2627-2642. million children, adolescents, and adults. *The Lancet*, 390(10113), 2627–2642. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32129-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3)

ABEDELMALEK, Salma, et al. Is Obesity a Risk Factor of Bullying at Intermediate School?. *International Journal of Body, Mind & Culture (2345-5802)*, 2024, 11.1.

AKBARI, Parsa, et al. Sequencing of 640,000 exomes identifies GPR75 variants associated with protection from obesity. *Science*, 2021, 373.6550: eabf8683.

ALBUQUERQUE, David, et al. Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. *Molecular genetics and genomics*, 2015, 290: 1191-1221.

AL-JAWADI, Athraa Alaulddin, et al. Association of FTO rs1421085 single nucleotide polymorphism with fat and fatty acid intake in Indonesian adults. *BMC Research Notes*, 2021, 14: 1-7.

ALLISON, David B., et al. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 1996, 20.6: 501-506.

ANDERSEN, Lars Bo. Atividade física em adolescentes. *Jornal de Pediatria*, 2009, 85: 281-283.

ARGYROPOULOS, George, et al. A polymorphism in the human agouti-related protein is associated with late-onset obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002, 87.9: 4198-4202.

ARSLAN, Sinan, et al. Sequencing by avidity enables high accuracy with low reagent consumption. *Nature biotechnology*, 2024, 42.1: 132-138.

BARUČIJA-ÖZÇOBAN, Indira, et al. A Decade of the common FTO Rs9939609 polymorphism: A systematic review. *Collegium antropologicum*, 2018, 42.2: 147-158.

BAXTER-JONES, Adam DG, et al. The influence of physical activity on lean mass accrual during adolescence: a longitudinal analysis. *Journal of Applied Physiology*, 2008, 105.2: 734-741.

BAZZANO, L. A., et al. Childhood obesity patterns and relation to middle-age sleep apnoea risk: the Bogalusa Heart Study. *Pediatric obesity*, 2016, 11.6: 535-542.

BEN HALIMA, Meriam, et al. The rs9939609 polymorphism in the fat mass and obesity associated (FTO) gene is associated with obesity in Tunisian population. *Biomarkers*, 2018, 23.8: 787-792.

BENDLOVÁ, B., et al. ZBTB16 gene variability influences obesity-related parameters and serum lipid levels in Czech adults. *Physiological Research*, 2017, 66: S425-S431.

BENZINOU, Michael, et al. Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nature genetics*, 2008, 40.8: 943-945.

BLACK, Mary Helen, et al. Increased asthma risk and asthma-related health care complications associated with childhood obesity. *American journal of epidemiology*, 2013, 178.7: 1120-1128.

BOYCOTT, Kym M., et al. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14.10: 681-691.

BROWN, Vicki, et al. Cost-effectiveness of reducing children's sedentary time and increasing physical activity at school: the Transform-Us! intervention. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 2024, 21.1: 15.

COSTOYA, J. A.; HOBBS, R. M.; PANDOLFI, P. P. Cyclin-dependent kinase antagonizes promyelocytic leukemia zinc-finger through phosphorylation. *Oncogene*, 2008, 27.27: 3789-3796.

DA SILVA, Tainara Emilia Rodrigues, et al. The FTO rs9939609 polymorphism and obesity risk in teens: Evidence-based meta-analysis. *Obesity research & clinical practice*, 2018, 12.5: 432-437.

DE RUBEIS, Vanessa, et al. Trajectories of body mass index, from adolescence to older adulthood, and pancreatic cancer risk; a population-based case-control study in Ontario, Canada. *Cancer Causes & Control*, 2019, 30: 955-966.

KÖSEM, Dilek Demir; DEMİR, Şenay; BEKTAŞ, Murat. The effect of middle and high school students' emotional eating behavior on obesity. *Journal of Pediatric Nursing*, 2024.

DIELS, Sara; VANDEN BERGHE, Wim; VAN HUL, Wim. Insights into the multifactorial causation of obesity by integrated genetic and epigenetic analysis. *Obesity Reviews*, 2020, 21.7: e13019.

DOAEI, S., et al. The effect of rs9930506 FTO gene polymorphism on obesity risk: a meta-analysis. *Biomolecular concepts*, 2019, 10.1: 237-242.

DOSDA, Sonia; RENARD, Emeline; MEYRE, David. Sequencing methods, functional characterization, prevalence, and penetrance of rare coding mutations in panels of monogenic obesity genes from the leptin-melanocortin pathway: A systematic review. *Obesity Reviews*, 2024, e13754.

EGHBALI, Maryam, et al. Genetic Variants in the Fat Mass and Obesity-Associated Gene and Risk of Obesity/Overweight in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism*, 2024, 7.4: e00510.

ELMAOĞULLARI, Selin, et al. Prevalence of dyslipidemia and associated factors in obese children and adolescents. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, 2015, 7.3: 228.

FAHNENSTICH, Jasmin, et al. Promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF) is a glucocorticoid-and progesterone-induced transcription factor in human endometrial stromal cells and myometrial smooth muscle cells. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 2003, 9.10: 611-623.

FISMEN, Anne-Siri, et al. Socioeconomic differences in food habits among 6-to 9-year-old children from 23 countries—WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI 2015/2017). *Obesity reviews*, 2021, 22: e13211.

FRAYLING, Timothy M., et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 2007, 316.5826: 889-894.

GALLER, Angela, et al. Clinical characteristics and outcomes of children, adolescents and young adults with overweight or obesity and mental health disorders. *International Journal of Obesity*, 2024, 48.3: 423-432.

GRACE, Jeanne, et al. Effect of physical activity and nutrition education on body mass index, blood pressure and biochemical variables in overweight and obese adolescents. *Annals of Global Health*, 2021, 87.1.

GRIGNANI, Francesco, et al. Fusion proteins of the retinoic acid receptor- α recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*, 1998, 391.6669: 815-818.

GUIDEZ, Fabien, et al. Histone acetyltransferase activity of p300 is required for transcriptional repression by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Molecular and cellular biology*, 2005, 25.13: 5552-5566.

VOJTECH HAINER, M. D.; HERMANN TOPLAK, M. D.; MITRAKOU, Asimina. Treatment Modalities of Obesity: What fits whom?. *Diabetes care*, 2008, 31: S269.

HERBERT, Alan, et al. A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science*, 2006, 312.5771: 279-283.

HINNEY, A., et al. Systematic mutation screening of the pro-opiomelanocortin gene: identification of several genetic variants including three different insertions, one nonsense and two missense point mutations in probands of different weight extremes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1998, 83.10: 3737-3741.

HIRAIKE, Yuta, et al. FTO obesity variant–exercise interaction on changes in body weight and BMI: the Taiwan Biobank study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2021, 106.9: e3673-e3681.

CHEN, Siyu, et al. Control of hepatic gluconeogenesis by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Molecular endocrinology*, 2014, 28.12: 1987-1998.

JAHANGIR, Melika, et al. Where do obesity and male infertility collide?. *BMC Medical Genomics*, 2024, 17.1: 128.

JAVED, A., et al. Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Pediatric obesity*, 2015, 10.3: 234-244.

IM KANG, Soo, et al. Modification of promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) by SUMO-1 conjugation regulates its transcriptional repressor activity. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278.51: 51479-51483.

KATUS, Urmeli, et al. Association of FTO rs1421085 with obesity, diet, physical activity, and socioeconomic status: A longitudinal birth cohort study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2020, 30.6: 948-959.

KILPELÄINEN, Tuomas O., et al. Genome-wide meta-analysis uncovers novel loci influencing circulating leptin levels. *Nature communications*, 2016, 7.1: 10494.

KLEINENDORST, Lotte, et al. Genetic obesity: next-generation sequencing results of 1230 patients with obesity. *Journal of medical genetics*, 2018, 55.9: 578-586.

KUMAR, Seema; KELLY, Aaron S. Review of childhood obesity: from epidemiology, etiology, and comorbidities to clinical assessment and treatment. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, 2017. p. 251-265.

KUNESOVA, Marie, et al. Change in overweight and obesity prevalence and adipose tissue distribution in seven-year-old Czech children (COSI project) 2008 to 2016. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2020, 79.OCE2: E590.

LEE, Eun Young; YOON, Kun-Ho. Epidemic obesity in children and adolescents: risk factors and prevention. *Frontiers of medicine*, 2018, 12: 658-666.

LI, Jia-Yuan, et al. Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272.36: 22447-22455.

LIBUY, Nicolás, et al. Fast food proximity and weight gain in childhood and adolescence: Evidence from Great Britain. *Health Economics*, 2024, 33.3: 449-465.

LIŠKA, František, et al. Downregulation of Plzf gene ameliorates metabolic and cardiac traits in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 2017, 69.6: 1084-1091.

LLEWELLYN, Alexis, et al. Childhood obesity as a predictor of morbidity in adulthood: a systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews*, 2016, 17.1: 56-67.

LLEWELLYN, Clare H.; FILDES, Alison. Behavioural susceptibility theory: Professor Jane Wardle and the role of appetite in genetic risk of obesity. *Current obesity reports*, 2017, 6: 38-45.

LOOS, Ruth JF; YEO, Giles SH. The genetics of obesity: from discovery to biology. *Nature Reviews Genetics*, 2022, 23.2: 120-133.

LU, Yingchang, et al. New loci for body fat percentage reveal link between adiposity and cardiometabolic disease risk. *Nature communications*, 2016, 7.1: 10495.

MAJITHIA, Amit R., et al. Rare variants in PPARG with decreased activity in adipocyte differentiation are associated with increased risk of type 2 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111.36: 13127-13132.

MALDEN, Stephen, et al. Obesity in young children and its relationship with diagnosis of asthma, vitamin D deficiency, iron deficiency, specific allergies and flat-footedness: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, 2021, 22.3: e13129.

MANCO, Licínio, et al. Next-generation sequencing of 12 obesity genes in a Portuguese cohort of patients with overweight and obesity. *European Journal of Medical Genetics*, 2023, 66.4: 104728.

MCCAFFERY, Jeanne M., et al. Obesity susceptibility loci and dietary intake in the Look AHEAD Trial. *The American journal of clinical nutrition*, 2012, 95.6: 1477-1486.

MIKKELSEN, Tarjei S., et al. Comparative epigenomic analysis of murine and human adipogenesis. *Cell*, 2010, 143.1: 156-169.

MOORE, William E., et al. Peer reviewed: body mass index and blood pressure screening in a rural public school system: the Healthy Kids Project. *Preventing chronic disease*, 2006, 3.4.

MORADI, Maedeh, et al. Association between overweight/obesity with depression, anxiety, low self-esteem, and body dissatisfaction in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 62.2: 555-570.

MORELLI, Catia, et al. Impact of vigorous-intensity physical activity on body composition parameters, lipid profile markers, and irisin levels in adolescents: a cross-sectional study. *Nutrients*, 2020, 12.3: 742.

MUHA, Jessica, et al. Depression and Emotional Eating in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Appetite*, 2024, 107511.

MUSIĆ MILANOVIĆ, Sanja, et al. Socioeconomic disparities in physical activity, sedentary behavior and sleep patterns among 6-to 9-year-old children from 24 countries in the WHO European region. *Obesity Reviews*, 2021, 22: e13209.

MUSIĆ MILANOVIĆ, Sanja, et al. Socioeconomic disparities in physical activity, sedentary behavior and sleep patterns among 6-to 9-year-old children from 24 countries in the WHO European region. *Obesity Reviews*, 2021, 22: e13209.

NDIAYE, Fatou K., et al. The expression of genes in top obesity-associated loci is enriched in insula and substantia nigra brain regions involved in addiction and reward. *International journal of obesity*, 2020, 44.2: 539-543.

NICHOLLS, A. S., et al. Change in body mass index during middle age affects risk of total knee arthroplasty due to osteoarthritis: a 19-year prospective study of 1003 women. *The Knee*, 2012, 19.4: 316-319.

NINDREA, Ricvan Dana; THONGWICHIAN, Phonchai. FTO gene polymorphisms rs9939609 and the risk of obesity among adults in Western and Asian countries: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 2024, 101621.

NORDANG, Gry BN, et al. Next-generation sequencing of the monogenic obesity genes LEP, LEPR, MC4R, PCSK1 and POMC in a Norwegian cohort of patients with morbid obesity and normal weight controls. *Molecular genetics and metabolism*, 2017, 121.1: 51-56.

NOVELLI, Giuseppe, et al. Genetics: A starting point for the prevention and the treatment of obesity. *Nutrients*, 2023, 15.12: 2782.

IUA, Pankov, et al. Screening of mutations in genes of pro-opiomelanocortin in patients with constitutional exogenous obesity. *Voprosy Meditsinskoi Khimii*, 2002, 48.1: 121-130.

PARK, Sungshim Lani, et al. Association of the FTO obesity risk variant rs8050136 with percentage of energy intake from fat in multiple racial/ethnic populations: the PAGE study. *American journal of epidemiology*, 2013, 178.5: 780-790.

PATE, Russell R., et al. Compliance with physical activity guidelines: prevalence in a population of children and youth. *Annals of epidemiology*, 2002, 12.5: 303-308.

PHELPS, Nowell H., et al. Worldwide trends in underweight and obesity from 1990 to 2022: a pooled analysis of 3663 population-representative studies with 222 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*, 2024, 403.10431: 1027-1050.

POOROLAJAL, Jalal, et al. Behavioral factors influencing childhood obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity research & clinical practice*, 2020, 14.2: 109-118.

POOSRI, Sakawrut, et al. Association of FTO variants rs9939609 and rs1421085 with elevated sugar and fat consumption in adult obesity. *Scientific Reports*, 2024, 14.1: 25618.

POULIOU, Theodora, et al. Environmental influences on children's physical activity. *J Epidemiol Community Health*, 2015, 69.1: 77-85.

PULIT, Sara L., et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for body fat distribution in 694 649 individuals of European ancestry. *Human molecular genetics*, 2019, 28.1: 166-174.

PUSZYK, William, et al. The epigenetic regulator PLZF represses L1 retrotransposition in germ and progenitor cells. *The EMBO journal*, 2013, 32.13: 1941-1952.

PUSZYK, William, et al. The epigenetic regulator PLZF represses L1 retrotransposition in germ and progenitor cells. *The EMBO journal*, 2013, 32.13: 1941-1952.

QURESHI, Sarah Anwar, et al. rs3751812, a common variant in fat mass and obesity-associated (FTO) gene, is associated with serum high-and low-density lipoprotein cholesterol in Pakistani individuals. *Nutrition*, 2017, 39: 92-95.

RANKINEN, Tuomo, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity*, 2006, 14.4: 529-644.

RASK-ANDERSEN, Mathias, et al. Genome-wide association study of body fat distribution identifies adiposity loci and sex-specific genetic effects. *Nature communications*, 2019, 10.1: 339.

ROBINO, Antonietta, et al. A brief review of genetic approaches to the study of food preferences: current knowledge and future directions. *Nutrients*, 2019, 11.8: 1735.

SEDLAK, Petr, et al. Růstové grafy–limity jejich aktuálního použití. *Pediatric pro praxi*, 2014, 15.2: 113-116.

SAEED, Sadia; BONNEFOND, Amélie; FROGUEL, Philippe. Obesity: exploring its connection to brain function through genetic and genomic perspectives. *Molecular Psychiatry*, 2024, 1-8.

SALLIS, James F.; SAELENS, Brian E. Assessment of physical activity by self-report: status, limitations, and future directions. *Research quarterly for exercise and sport*, 2000, 71.sup2: 1-14.

SALONNA, Ferdinand, et al. How Czech Adolescents Perceive Their Physical Activity. *Children*, 2023, 10.7: 1134.

SEDLAK, Petr, et al. Secular changes of adiposity and motor development in Czech preschool children: Lifestyle changes in fifty-five year retrospective study. *BioMed Research International*, 2015, 2015.1: 823841.

SEDLAK, Petr, et al. Secular changes of adiposity in Czech children aged from 3 to 6 years: latent obesity in preschool age. *BioMed Research International*, 2017, 2017.1: 2478461.

SHAH, Bhavik P., et al. Functional characterization of all missense variants in LEPR, PCSK1, and POMC genes arising from single-nucleotide variants. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 2023, 18.2: 209-219.

SHARMA, Tanmayi; BADARUDDOZA, Badaruddoza. Genetic association of FTO gene polymorphisms with obesity and its related phenotypes: A case-control study. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*, 2024, 16.2: 102.

SHARMA, Vishal, et al. A systematic review and meta-analysis estimating the population prevalence of comorbidities in children and adolescents aged 5 to 18 years. *Obesity Reviews*, 2019, 20.10: 1341-1349.

SHAW, D. M.; ELGER, B. S.; COLLEDGE, Flora. What is a biobank? Differing definitions among biobank stakeholders. *Clinical genetics*, 2014, 85.3: 223-227.

SCHEFE, Jan H., et al. A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circulation research*, 2006, 99.12: 1355-1366.

SIGMUND, Erik, et al. Time-trends and correlates of obesity in Czech adolescents in relation to family socioeconomic status over a 16-year study period (2002–2018). *BMC Public Health*, 2020, 20: 1-12.

SILVENTOINEN, Karri, et al. The genetic and environmental influences on childhood obesity: a systematic review of twin and adoption studies. *International journal of obesity*, 2010, 34.1: 29-40.

SIMMONDS, Mark, et al. Predicting adult obesity from childhood obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews*, 2016, 17.2: 95-107.

SINGH, Kulwinder; SHEN, Biing-Jiun. Abdominal obesity and chronic stress interact to predict blunted cardiovascular reactivity. *International journal of psychophysiology*, 2013, 90.1: 73-79.

SMEMO, Scott, et al. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*, 2014, 507.7492: 371-375.

SOBIESZCZUK, Dorothy F., et al. A feedback loop mediated by degradation of an inhibitor is required to initiate neuronal differentiation. *Genes & development*, 2010, 24.2: 206-218.

SPEAKMAN, John R. The 'fat mass and obesity related'(FTO) gene: mechanisms of impact on obesity and energy balance. *Current obesity reports*, 2015, 4.1: 73-91.

STUNKARD, Albert J.; FOCH, Terryl T.; HRUBEC, Zdenek. A twin study of human obesity. *Jama*, 1986, 256.1: 51-54.

STUNKARD, Albert J., et al. The body-mass index of twins who have been reared apart. *New England journal of medicine*, 1990, 322.21: 1483-1487.

SULC, Jonathan, et al. Heterogeneity in obesity: genetic basis and metabolic consequences. *Current diabetes reports*, 2020, 20: 1-8.

SULIMAN, Bandar Ali; XU, Dakang; WILLIAMS, Bryan Raymond George. The promyelocytic leukemia zinc finger protein: two decades of molecular oncology. *Frontiers in oncology*, 2012, 2: 74.

SUN, Qi, et al. Genome-wide association study identifies polymorphisms in LEPR as determinants of plasma soluble leptin receptor levels. *Human molecular genetics*, 2010, 19.9: 1846-1855.

ŠEDA, O., et al. ZBTB16 and metabolic syndrome: a network perspective. *Physiological research*, 2017, 66: S357-S365.

TRANG, Khanh; GRANT, Struan FA. Genetics and epigenetics in the obesity phenotyping scenario. *Reviews in endocrine and metabolic disorders*, 2023, 24.5: 775-793.

VÁŽNÁ, Anna, et al. Influence of COVID-19-related restrictions on the prevalence of overweight and obese Czech children. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19.19: 11902.

VELAZQUEZ-ROMAN, Jorge, et al. Association of PCSK1 and PPARG1 Allelic Variants with Obesity and Metabolic Syndrome in Mexican Adults. *Genes*, 2023, 14.9: 1775.

VESNINA, Anna, et al. Genes and eating preferences, their roles in personalized nutrition. *Genes*, 2020, 11.4: 357.

VIGNEROVÁ, J., et al. 6. celostátní antropologický výzkum dětí a mládeže. *Česká Republika. Praha: PřF UK a SZÚ, 2001.*

WANG, Youfa, et al. Association between obesity and kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Kidney international*, 2008, 73.1: 19-33.

WEIHRAUCH-BLÜHER, Susann; WIEGAND, Susanna. Risk factors and implications of childhood obesity. *Current obesity reports*, 2018, 7: 254-259.

XIA, Qianghua; GRANT, Struan FA. The genetics of human obesity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013, 1281.1: 178-190.

YANG, Chih-Hsiang, et al. Independent phenotypic plasticity axes define distinct obesity subtypes. *Nature metabolism*, 2022, 4.9: 1150-1165.

YENGO, Loic, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~ 700000 individuals of European ancestry. *Human molecular genetics*, 2018, 27.20: 3641-3649.

YOUNG, T. Kue, et al. Childhood obesity in a population at high risk for type 2 diabetes. *The Journal of pediatrics*, 2000, 136.3: 365-369.

14.1. Internetové zdroje

URL1: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

URL2: <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>

URL3: <https://szu.gov.cz/publikace-szu/data/hodnoceni-rustu-a-vyvoje/rustove-grafy-ke-stazeni/>

URL4: https://cspmla.cz/projects/rust2/obsah_cd/_sds.htm

URL5: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015128>

URL6: <https://www.integra-biosciences.com/global/en/blog/article/comprehensive-introduction-dna-extraction>