

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Karolína Petruš

**Nutrigenetická analýza metabolického syndromu: role chromozomu 4
spontánně hypertenzního kmene potkana**

Nutrigenetic analysis of metabolic syndrome: the role of spontaneously hypertensive rat
chromosome 4

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. MUDr. Ondřej Šeda, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze, 10.8.2020

Podpis

Karolína Petřů

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Ondřeji Šedovi, Ph.D. za jeho cenné odborné rady, ochotu a čas, který mi věnoval v průběhu vypracování této diplomové práce.

Zároveň bych zde chtěla poděkovat pracovníkům z Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN v Praze, a to především Michaele Janků a Ing. Blance Chylíkové za jejich pomoc a přínosné rady, které mi poskytly během práce v laboratoři.

V neposlední řadě také děkuji své rodině za podporu při studiu.

Abstrakt

Metabolický syndrom (MetS) je komplexní onemocnění, na jehož patogenezi se podílí řada interagujících genů, faktory epigenetické a komponenta prostředí. Z analýzy genetických aspektů MetS u experimentálních modelů vyplynulo, že řada definujících parametrů MetS je ve vazbě s oblastmi chromozomu 4 laboratorního potkana. Pro ověření těchto lokusů kvantitativních znaků (QTL) byl vytvořen dvojité kongenní kmen, u kterého jsou části chromozomu 4 spontánně hypertenzního kmene potkana (SHR, inbrední model MetS) vneseny na genomické pozadí kongenního kmene Brown Norway (BN-*Lx*). Cílem diplomové práce je detailně geneticky zmapovat diferenciální segment tohoto dvojité kongenního kmene BN-*Lx*.SHR4, porovnat jeho metabolický profil za podmínek diet o různém obsahu sacharidů a tuků a identifikovat pomocí komparace sekvencí a genové exprese kandidátní geny či polymorfismy pro aspekty MetS, resp. potenciální nutrigenetické interakce.

Klíčová slova:

nutrigenetika, experimentální modely, metabolický syndrom, kongenní kmen, genotypizace, potkan

Abstract

Metabolic syndrome (MetS) is a complex condition with a number of interacting genes, epigenetic and environmental factors underlying its pathogenesis. The analysis of genetic component of MetS showed that number of defining parameters of the syndrome is linked to regions of rat chromosome 4. In order to verify these quantitative trait loci (QTL), a double congenic strain was derived with parts of chromosome 4 of spontaneously hypertensive rat (SHR, an inbred MetS model) origin introgressed onto genomic background of congenic Brown Norway strain (BN-*Lx*). The aim of the proposed thesis is comprise detail genetic mapping of differential segments of the above mentioned double congenic strain BN-*Lx*.SHR4 and comparison of its metabolic profile under different dietary conditions with varying carbohydrate and fat content. Utilizing DNA sequence and gene expression comparisons, candidate genes or polymorphisms for the MetS aspects and potential nutrigenetic interactions will be identified.

Key words:

nutrigenetics, experimental models, metabolic syndrome, congenic strain, genotyping, rat

Obsah

| | |
|---|----|
| 1 Úvod..... | 12 |
| 2 Přehled literatury..... | 13 |
| 2.1 Metabolický syndrom..... | 13 |
| 2.1.1 Diagnostická kritéria..... | 13 |
| 2.1.2 Metabolický syndrom a jeho komorbidity..... | 14 |
| 2.1.2.1 Obezita..... | 14 |
| 2.1.2.2 Inzulínová rezistence..... | 15 |
| 2.1.2.3 Hormonální dysbalance..... | 15 |
| 2.1.2.4 Dyslipidémie..... | 16 |
| 2.1.2.5 Hypertenze..... | 16 |
| 2.1.3 Genetické predispozice..... | 17 |
| 2.1.3.1 Genetická analýza metabolického syndromu..... | 17 |
| 2.1.3.2 Genetická komponenta obezity..... | 17 |
| 2.1.3.3 Genetická komponenta inzulínové rezistence..... | 18 |
| 2.1.3.4 Genetická komponenta dyslipidémie..... | 19 |
| 2.1.4 Epigenetika a metabolický syndrom..... | 20 |
| 2.1.5 Dieta a metabolický syndrom..... | 21 |
| 2.1.5.1 Mastné kyseliny..... | 21 |
| 2.1.5.2 Sacharidy..... | 22 |
| 2.2 Genetická analýza komplexních onemocnění..... | 24 |
| 2.2.1 Celogenomové asociační studie (GWAS)..... | 24 |
| 2.2.2 Vazebná analýza (QTL mapování)..... | 25 |
| 2.2.2.1 Analýza kandidátních genů..... | 25 |
| 2.2.2.2 Poziční klonování..... | 25 |
| 2.2.3 Systémová genetika..... | 26 |
| 2.2.3.1 Genom..... | 27 |
| 2.2.3.2 Transkriptom..... | 27 |
| 2.2.3.3 Proteom..... | 28 |
| 2.2.3.4 Metabolom..... | 28 |
| 2.2.3.5 Teorie sítí..... | 29 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.2.3.6 | Potkan jako modelový organismus pro systémovou genetiku..... | 30 |
| 3 | Cíle práce..... | 33 |
| 4 | Materiál a metody..... | 34 |
| 4.1 | Modelové organismy..... | 34 |
| 4.1.1 | Experimentální modelové kmeny laboratorního potkana..... | 34 |
| 4.1.1.1 | Spontánně hypertenzní kmen potkana (SHR, RGD ID 61000)..... | 34 |
| 4.1.1.2 | Kmen Brown Norway (BN/Cub, RGD ID 737899)..... | 35 |
| 4.1.1.3 | Polydaktylní kmen potkana (PD/Cub, RGD ID 728161)..... | 35 |
| 4.1.1.4 | Kongenní kmen (BN-Lx, RGD ID 61117)..... | 35 |
| 4.1.1.5 | Dvojitě kongenní kmen (BN-Lx.SHR4)..... | 35 |
| 4.2 | Diety..... | 37 |
| 4.2.1 | Standardní dieta (STD)..... | 37 |
| 4.2.2 | Vysokosacharózová dieta (HSD)..... | 38 |
| 4.3 | Molekulární metody..... | 39 |
| 4.3.1 | Genotypizace..... | 39 |
| 4.3.1.1 | Izolace DNA..... | 39 |
| 4.3.1.2 | Polymerázová řetězová reakce (PCR)..... | 39 |
| 4.3.1.3 | Gelová elektroforéza..... | 40 |
| 4.3.2 | Analýza genové exprese..... | 41 |
| 4.3.2.1 | Izolace RNA..... | 41 |
| 4.3.2.2 | Kvantitativní polymorázová řetězová reakce (qPCR)..... | 41 |
| 4.3.2.3 | DNA microarray..... | 42 |
| 4.4 | Metabolická analýza..... | 43 |
| 4.4.1 | Základní metabolické parametry..... | 43 |
| 4.4.1.1 | Orální glukózový toleranční test (OGTT)..... | 43 |
| 4.4.1.2 | Měření lipidů..... | 43 |
| 4.4.1.3 | Měření hormonů a cytokinů..... | 43 |
| 4.5 | Bionformatická a statistická analýza..... | 45 |
| 4.5.1 | In silico analýza DNA sekvencí..... | 45 |
| 4.5.2 | Analýza transkriptomických dat..... | 45 |
| 4.5.3 | Analýza metabolických dat..... | 45 |
| 5 | Výsledky..... | 46 |
| 5.1 | Diferenciální segment kmene BN-Lx.SHR4..... | 46 |
| 5.2 | <i>In silico</i> analýza DNA sekvence..... | 48 |

| | | |
|----------|--|----|
| 5.3 | Metabolický profil..... | 50 |
| 5.3.1 | Morfologické parametry..... | 50 |
| 5.3.2 | Orální glukózový toleranční test (OGTT)..... | 53 |
| 5.3.3 | Lipidy..... | 55 |
| 5.3.4 | Cytokiny..... | 59 |
| 5.3.5 | Hormony..... | 63 |
| 5.4 | Transkriptomický profil..... | 68 |
| 5.4.1 | Hlavní faktor: Kmen..... | 69 |
| 5.4.2 | Hlavní faktor: Dieta..... | 70 |
| 5.4.3 | Ověření genové exprese..... | 71 |
| 5.5 | Analýza regulačních uzlů..... | 72 |
| 6 | Diskuze..... | 73 |
| 6.1 | Genetická charakterizace kmene BN-Lx.SHR4..... | 73 |
| 6.1.1 | Kandidátní geny..... | 73 |
| 6.1.1.1 | <i>Ankrd26</i> | 73 |
| 6.1.1.2 | <i>Apobec1</i> | 73 |
| 6.1.1.3 | <i>Ccdc77</i> | 74 |
| 6.1.1.4 | <i>Cd163</i> | 74 |
| 6.1.1.5 | Geny komplexu C1 – <i>C1s</i> , <i>C1r</i> , <i>C1rl</i> | 75 |
| 6.1.1.6 | <i>Lpcat3</i> | 75 |
| 6.1.1.7 | <i>Ptpn6</i> | 76 |
| 6.1.1.8 | <i>Scnn1a</i> | 76 |
| 6.1.1.9 | <i>Slc6a13</i> | 76 |
| 6.1.1.10 | <i>Vwf</i> | 76 |
| 6.1.2 | Ostatní geny v diferenciálním segmentu..... | 77 |
| 6.2 | Metabolický profil BN-Lx.SHR4..... | 78 |
| 6.2.1 | Kontext metabolického profilu..... | 78 |
| 6.3 | Limitace provedených experimentů..... | 80 |
| 7 | Závěr..... | 81 |
| 8 | Seznam použité literatury..... | 82 |

Seznam zkratek

| | |
|------------|--|
| AACE | American Association of Clinical Endocrinologists |
| ADIPOQ | Adiponectin, C1Q And Collagen Domain Containing |
| Ankrd26 | Ankyrin Repeat Domain 26 |
| ANOVA | Analýza rozptylu (z angl. Analysis of Variance) |
| APOA | Apolipoprotein A1 |
| Apobec1 | Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 1 |
| ApoB | Apolipoprotein B |
| ApoE | Apolipoprotein E |
| ATPIII | Adult Treatment Panel III |
| AUC | Plocha pod křivkou (z angl. Area Under the Curve) |
| BAC | Bacterial Artificial Chromosome |
| BMI | Index tělesné hmotnosti (z angl. Body Mass Index) |
| BN-Lx | Kongenní kmen potkana Brown Norway |
| BN-Lx.SHR4 | Dvojitě kongenní kmen potkana Brown Norway a spontánně hypertenzního kmene potkana |
| Ccdc77 | Coiled-coil Domain Containing 77 |
| Cd163 | Cluster of Differentiation 163 |
| Cd36 | Cluster of Differentiation 36 |
| CETP | Cholesteryl Ester Transfer Protein |
| CLOCK | Clock Circadian Regulator |
| CM | Chylomikron |
| CRISPR | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats |
| EGIR | European Group for the study of Insulin Resistance |
| eQTL | Lokus regulující genovou expresi (z angl. Expression Quantitative trait locus) |
| ETT | Epididymální tuková tkáň |
| FABP2 | Fatty Acid Binding Protein 2 |
| FABP3 | Fatty Acid Binding Protein 3 |
| FOXC2 | Forkhead Box C2 |
| GABA | Kyselina gama-aminomáselná |
| Gadph | Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase |
| GCKR | Glucokinase Regulatory Protein |
| GIP | Gastrický inhibiční peptid |

| | |
|--------|--|
| GLP1 | Glukagon-like peptid 1 |
| GNB3 | G Protein Subunit Beta 3 |
| GROKC | Growth-regulated Oncogene / Alpha-chemokine |
| GWAS | Celogenomové asociační studie |
| HDL | Lipoprotein o vysoké hustotě (<i>z angl. High Density Lipoprotein</i>) |
| Hmbs | Porphobilinogen Deaminase |
| HPLC | Modifikovaná vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HSD | Vysokosacharózová dieta (<i>z angl. High Sacharose Diet</i>) |
| IDF | International Diabetes Federation |
| IFNG | Interferon Gamma |
| IGF2 | Insulin-like Growth Factor 2 |
| IL | Interleukin |
| IRS | Insulin Receptor Substrate |
| LDL | Lipoprotein o nízké hustotě (<i>z angl. Low Density Lipoprotein</i>) |
| Lpcat3 | Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3 |
| LPL | Lipoprotein Lipase |
| LRP1 | Low Density Lipoprotein Receptor 1 |
| MCP1 | Monocytchemotaktický protein 1 |
| MetS | Metabolický syndrom |
| OGTT | Orální glukózový toleranční test |
| PC1 | Proprotein Convertase 1 |
| PCR | Polymerázová řetězová reakce (<i>z angl. Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PER2 | Period Circadian Regulator 2 |
| Phc1 | Polyhomeotic Homolog 1 |
| PI3K | Fosfatidylinositol-3-kináza |
| PP | Protein P |
| PPAR | Receptory aktivované peroxizomovými proliferátory |
| Ppia | Peptidylpropyl Izomerase A |
| Ptpn6 | Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 6 |
| PYY | Peptid YY |
| qPCR | Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (<i>z angl. Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>) |
| QTL | Lokus kvantitativních znaků (<i>z angl. Quantitative Trait Locus</i>) |
| RGD | Rat Genome Database |
| RGSC | The Rat Genome Sequencing Project |
| RTT | Retroperitoneální tuková tkáň |

| | |
|---------|--|
| Scnn1a | Sodium Channel Epithelial 1 Subunit Alpha |
| SEM | Střední chyba průměru (<i>z angl. Standard Error of the Mean</i>) |
| SHR | Spontánně hypertenzní kmen potkana |
| Slc6a13 | Solute Carrier Family 6 Member 13 |
| SNP | Jednonukleotidový polymorfismus (<i>z angl. Single Nucleotide Polymorphism</i>) |
| SREBP1 | Sterol Regulatory Element-binding Transcription Factor 1 |
| SSLP | Simple Sequence Length Polymorphism |
| STD | Standardní dieta |
| TALEN | Transcription Activator-like Effector Nucleases |
| TG | Triacylglycerol |
| TNF | Tumor nekrotizující faktor |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VLDL | Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (<i>z angl. Very-Low Density Lipoprotein</i>) |
| Vwf | Von Willebrandův faktor |
| WHO | Světová zdravotnická organizace (<i>z angl. World Health Organization</i>) |

1 Úvod

Současná doba s sebou přinesla změnu životosprávy u většinové populace vyspělých států. Vlivem sedavého životního stylu a stravy, která je bohatá na tuky a jednoduché sacharidy, dochází k rozvoji mnoha civilizačních onemocnění. Jednou z těchto chorob, které v posledních letech komplikují život lidem po celém světě, je i metabolický syndrom (MetS) (Saklayen 2018).

Metabolický syndrom, dříve nazývaný také jako syndrom X, je charakterizován inzulínovou rezistencí, obezitou, hypertenzí a zvýšeným rizikem vzniku kardiovaskulárních chorob (Karimi et al. 2020). Mezi jeho časté projevy se řadí i zvýšená hladina glukózy v krvi a dyslipidémie. Výjimkou není ani výskyt trombózy, zvýšené zánětlivosti a nealkoholové ztučnění jater (Kassi et al. 2011). Výše zmíněné rizikové stavy, které jsou spjaté s MetS dokazují, jak komplexní a závažné toto onemocnění je.

Mezi rizikové faktory MetS patří snížená fyzická aktivita, vyšší věk, hormonální nerovnováha a také genetická predispozice. Nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro manifestaci tohoto syndromu je ovšem obezita (Grundy 2006). Na rozvoji obezity se podílí především omezená fyzická aktivita a vysokotučná a vysokosacharidová dieta, které interagují s rizikovými alelami genetického pozadí jedince.

Vlivem příjmu živin dochází ke změnám v genové expresi a ovlivnění metabolických drah, které se uplatňují i v patogenezi metabolického syndromu. Nedílnou součástí této diplomové práce je proto nutrigenetický přístup, který integruje vzájemné působení genetických a exogenních vlivů.

Jedním z modelových organismů pro studium MetS je spontánně hypertenzní kmen potkana (SHR), jehož genetická predispozice k MetS je polygenní, jako významná se jeví mimojiné mutace translokázy mastných kyselin Cd36/Fat (Pravenec et al. 2014).

Pro účely této diplomové práce byl jako modelový organismus zvolen dvojitě kongenní kmen potkana, který vzniknul křížením kmene SHR a již kongenního kmene Brown Norway (BN-*Lx*). Takto vytvořený dvojitě kongenní kmen BN-*Lx*.SHR4 má na genetické pozadí BN-*Lx* vnesenu část genomu SHR. Tento diferenciální segment se nachází na čtvrtém chromozomu (Šedová et al. 2012).

Cílem této práce je definovat genetické pozadí potkaního kmene BN-*Lx*.SHR4 a následně pomocí metod integrativní genomiky prozkoumat vliv interakce diety a genů na metabolické dráhy, které se uplatňují při rozvoji metabolického syndromu.

2 Přehled literatury

2.1 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom je komplexní multifaktoriální onemocnění s celosvětově vysokou prevalencí. Podíl na etiologii tohoto onemocnění mají dědičné predispozice a významně jsou zapojeny také vnější faktory, jako je výběr diety a životního stylu. Prevalence se liší v závislosti na regionu a individuální kompozici jedince (například věk, pohlaví, rasa) (Kaur 2014). Dle studie na středním východě byl výskyt MetS vyšší v urbánních oblastech a u žen. Rizikovým je také vyšší věk. (Delavari et al. 2009).

Zvýšený příjem energie, často v podobě potravin s vysokým obsahem sacharidů a tuků, a snížený výdej energie způsobený vlivem sedavého životního stylu často vede k obezitě, která se pojí k manifestaci MetS a dalším komplikacím spojeným s tímto syndromem. Mezi tyto komplikace se řadí dyslipidémie, tedy zvýšená koncentrace triacylglycerolů (TG), snížená hladina lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL) a taktéž zvýšená koncentrace glukózy v krvi nalačno. Tato kombinace pak vede k inzulinové rezistenci, hypertenzi, kardiovaskulárním chorobám, ztučnění jater a dalším patologiím (Kassi et al. 2011; Karimi et al. 2020; Saklayen 2018).

2.1.1 Diagnostická kritéria

První kritéria pro diagnózu MetS byla vydána v roce 1998 Světovou zdravotnickou organizací (WHO), podobná diagnostická kritéria definovaly i další odborné organizace zabývající se inzulinovou rezistencí a diabetem (například EGIR, AACE, ATPIII a IDF). Nicméně byla snaha o zavedení jednotných vyhodnocovacích kritérií, a proto byla v roce 2009 publikována nová sjednocující kritéria pro MetS (viz *Tabulka 1*).

| Klinické kritérium | Hraniční hodnota |
|------------------------------------|--|
| Zvětšený obvod pasu | populačně specifické kritérium |
| Zvýšená hladina triacylglycerolů * | > 150 mg/dL |
| Snížená hladina HDL cholesterolu * | < 40 mg/dL (muži); < 50 mg/dL (ženy) |
| Zvýšený krevní tlak * | systolický < 130 a/nebo diastolický < 85 mm Hg |
| Zvýšená hladina krevní glukózy * | >100 mg/dL |

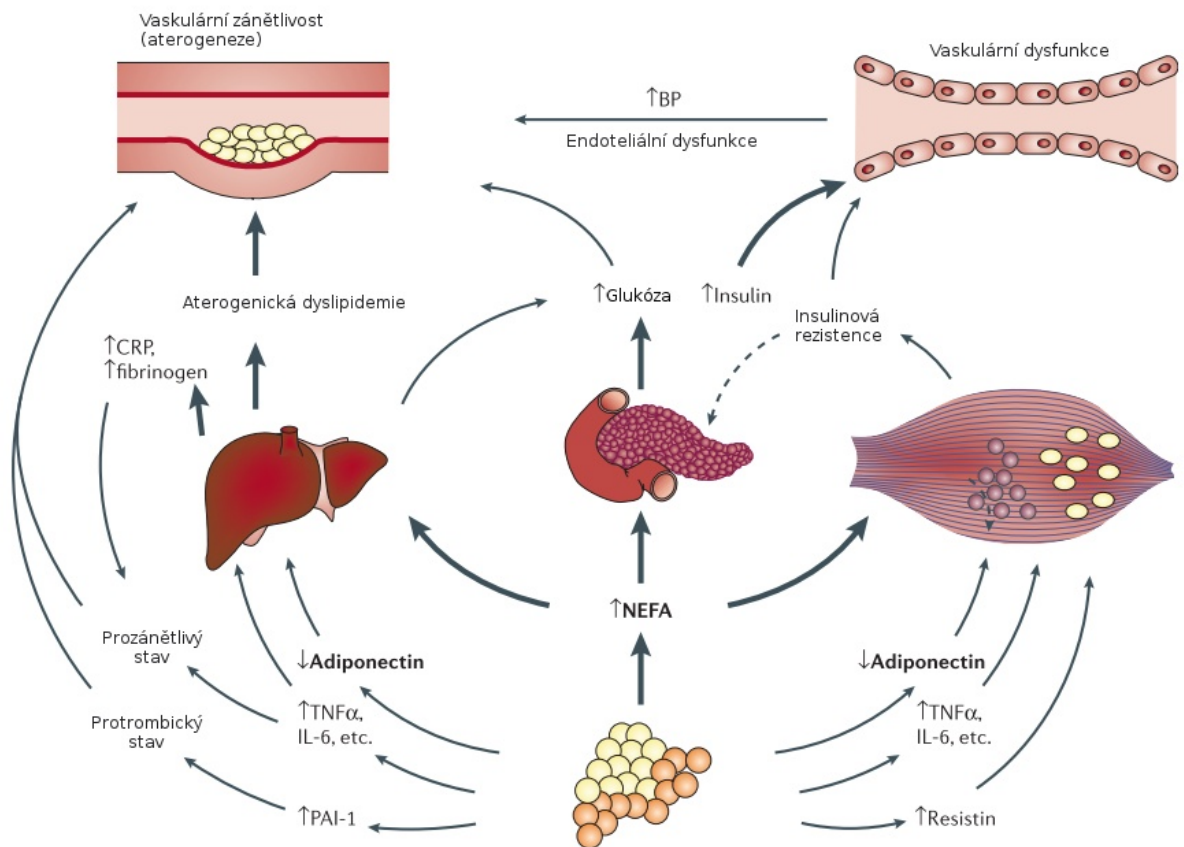
* nebo probíhající léčba tohoto stavu

Tabulka 1: Kritéria pro klinickou diagnózu MetS (Alberti et al. 2009)

2.1.2 Metabolický syndrom a jeho komorbidity

2.1.2.1 Obezita

Dle WHO je obezita jedním z nejvíce zřejmých a zároveň zanedbávaných problémů, s kterými se v současnosti potýká celosvětová populace. Obezita s sebou přináší řadu zdravotních problémů a omezení, která snižují kvalitu a délku života. Mnoho komorbidit vázaných k obezitě se sdružuje právě v metabolickém syndromu (Haslam 2005).



Obrázek 1: Souvislost obezity a metabolického syndromu (Grundy 2006)

S narůstajícím objemem tukové tkáně dochází k zvýšené produkci adipocytokinů, které se podílejí na rozvoji MetS. Lipolýzou TG dochází k uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA), které se ektopicky ukládají ve svalech, játrech a pankreatických β buňkách. Následkem toho vzniká aterogenní dyslipidémie, inzulínová rezistence a zároveň se zvyšuje hladina inzulínu v krvi a dochází k hyperinzulinémii.

S množstvím tukové tkáně negativně koreluje hladina adiponektinu - hormonu, který mimo jiné zvyšuje citlivost tkání k inzulínu. Jeho nedostatek se tedy projevuje opět prohloubením inzulínové rezistence.

Dále dochází ke zvýšené produkci zánětlivých cytokinů (TNF α , IL-6, atd.) a inhibitoru plasminogenového aktivátoru 1 (PAI-1). Následkem toho bývá protrombotický a prozánětlivý stav. Nadprodukce adipocytokinů a snížená produkce adiponektinu přispívá k mnoha patologickým stavům, jako je například vaskulární dysfunkce, hypertenze, ateroskleróza a další (Grundy 2006).

2.1.2.2 Inzulínová rezistence

Viscerální tuková tkáň, která je důležitým endokrinním orgánem a významně se podílí na mnoha metabolických drahách, hraje jednu z hlavních rolí v rozvoji inzulínové rezistence, která je asociována s obezitou. To je charakterizováno sníženou citlivostí tkání na inzulín. Díky tomu dochází ke sníženému vstupu glukózy do buněk a následuje stav hyperglykémie. Inzulín ale nehraje klíčovou roli pouze v metabolismu glukózy, uplatňuje se také při metabolismu tuků a proteinů, působí na buněčnou diferenciaci a růst a také na endoteliální funkce. Inzulínová rezistence se tedy pak projevuje řadou metabolických poruch (Duvnjak and Duvnjak 2009).

2.1.2.3 Hormonální dysbalance

Adipocyty jsou základní stavební jednotkou tukové tkáně. Neslouží ale jen jako zásobárna energie, produkují i mnoho hormonů, které ovlivňují pocit hladu, sytosti a energetický metabolismus. Mezi nejvýznamnější z těchto látek patří adiponektin a leptin.

Leptin suprimuje chuť k jídlu a jeho genetická absence vede k masivní obezitě. Koncentrace tohoto hormonu je přímo úměrná k množství tukové tkáně a při obezitě vzniká leptinová rezistence. Jeho antagonistou je adiponektin, ten negativně koreluje s procentem tuku v organismu. Zesílená exprese adiponektinu je spojována s inzulínovou senzitivizací a má také pozitivní účinky na tukovou tkáň. Zmnožuje počet mitochondrií v adipocytech, zmenšuje jejich velikost a aktivuje transkripční faktory, které se podílí na esterifikaci volných mastných kyselin. Adiponektin má tak protektivní účinky na celkový metabolismus. Dysbalance v plazmatických hladinách těchto hormonů má pak za následek dyslipidémii, syndrom polycystických ovárií a diabetes mellitus 2. typu (Benrick et al. 2017; Saklayen 2018; Sanz-Fernandez et al. 2020)

2.1.2.4 Dyslipidémie

Dyslipidémie je charakterizována vyššími koncentracemi lipidů v plazmě. Inzulín za normálních okolností inhibuje lipolýzu v tukové tkáni. Při inzulínové rezistenci je lipolýza aktivnější a uvolňuje se větší množství neesterifikovaných mastných kyselin. Játra vstřebávají tyto uvolněné lipidy a následně produkují zvýšené množství lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL). Tyto lipoproteinové částice jsou pak v krevní plazmě za pomoci cholesterol-ester transferového proteinu (CETP) přeměny na HDL. Hromaděním VLDL v plazmě je pak CETP o to aktivnější a snižuje se tím koncentrace HDL, které jsou potřeba k vychytávání cholesterolu a jeho transferu zpět do jater. Inzulín také hraje roli při sekreci apolipoproteinu B, který je hlavní proteinovou komponentou VLDL částic. Inzulínová rezistence pak opět zvyšuje koncentraci těchto partikulí (Salhanick et al. 1991; Duvnjak and Duvnjak 2009).

Triacylglyceroly uvolněné z LDL jsou hydrolyzovány jaterní lipázou a vzniká málo densní LDL cholesterol, který má vysoký aterogenní potenciál (Ivanova et al. 2017).

Inzulínová rezistence tedy vede k neobvyklé koncentraci a rozložení lipidů, změně jejich metabolismu a zvyšuje riziko vzniku kardiovaskulárních chorob (Descamps et al. 2019).

2.1.2.5 Hypertenze

Zvýšený krevní tlak je asociován s již výše zmíněnými metabolickými poruchami, jako je například obezita, dyslipidémie a inzulínová rezistence. Hyperinzulinémie způsobená inzulínovou rezistencí indukuje hypertenzi přes aktivaci sympatického nervového a renin-angiotensin-aldosteronového systému. To vede k zadržování sodíku a endoteliální a renální dysfunkci. V neposlední řadě dochází k inhibici vazodilatace a sníženému vstřebávání glukózy, neboť exprimovaný angiotensin II blokuje schopnost inzulínu aktivovat PI3K (Fosfatidylinositol-3-kináza) (Ferrannini and Natali 1991; Low Wang et al. 2004).

2.1.3 Genetické predispozice

Metabolický syndrom je komplexní onemocnění podmíněné environmentálními i dědičnými faktory, které navzájem interagují. Každý rizikový faktor podílející se na rozvoji MetS podléhá své vlastní genetické kontrole a má tak jinou odpověď na různé exogenní vlivy (Kaur 2014). Četné výzkumy genetických predispozic MetS odhalují širokou škálu DNA polymorfismů v kandidátních genech a množství genových variant, které jsou asociovány s tímto onemocněním, přičemž většina z nich souvisí s metabolismem lipidů. Uplatňuje se zde také nespočet epigenetických mechanismů (Fathi Dizaji 2018).

2.1.3.1 Genetická analýza metabolického syndromu

Ačkoliv je analýza genetické determinace MetS velmi obtížná, vzhledem k široké škále faktorů podílejících se na rozvoji tohoto onemocnění, v předešlých letech se podařilo identifikovat množství kandidátních genů souvisejících s fenotypem MetS.

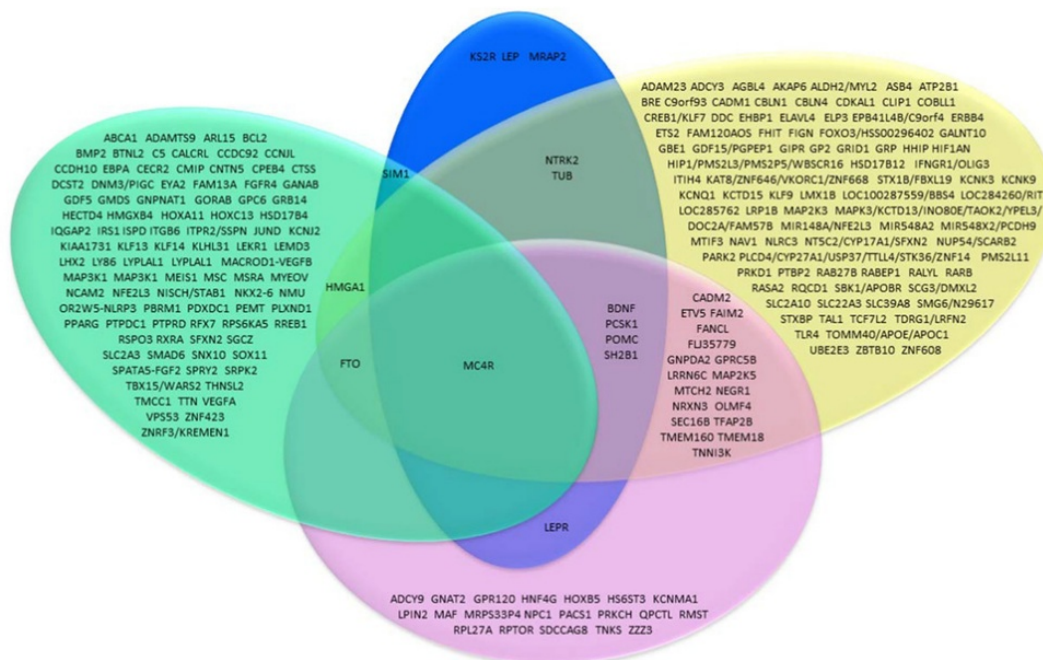
K popsání genetického pozadí MetS bylo provedeno množství studií kandidátních genů, uplatňujících se především při energetickém metabolismu. Taktéž byly provedeny celogenomové asociační studie napříč různými populacemi. Z výsledků velkého množství dat vyplývá, že genetické varianty asociované s MetS nejčastěji hrají roli při regulaci metabolismu lipidů. Příkladem jsou pak geny jako *APOA* (Apolipoprotein A1), *CETP*, *LPL* (Lipoprotein Lipase), *GCKR* (Glucokinase Regulatory Protein) a další (Stančáková and Laakso 2014).

MetS nicméně zahrnuje celou řadu komponent – jako je například obezita, inzulínová rezistence a dyslipidémie – a každá podléhá vlastní genetické kontrole. Četné množství kandidátních genů pro konkrétní komponenty MetS byly také identifikovány a jejich vzájemná asociace hraje roli při rozvoji MetS.

2.1.3.2 Genetická komponenta obezity

Genetická architektura obezity je opět komplexní a její detailní popis přesahuje rámec této diplomové práce. Obecně se dají vysledovat tři základní genetické způsoby determinace obezity. Prvním typem je monogenní obezita, která je důsledkem mutace jednoho genu, přičemž se nejčastěji jedná o geny zapojené v leptinové či melanokortinové dráze. Dalším typem je syndromická obezita, tedy obezita jako součást geneticky determinovaných syndromů zahrnujících více patologických stavů, jako je např. syndrom Bardet-Biedel.

Nejčastější je ovšem polygenní obezita vznikající v důsledku souhry desítek až stovek rizikových a protektivních alel v interakci s faktory prostředí. Množství asociačních a dalších studií identifikovalo velké množství genů, které se na jednotlivých typech obezity podílejí (Pigeyre et al. 2016)



Obrázek 2: Diagram genů determinujících rozvoj obezity (Pigeyre et al. 2016)

S obezitou jsou dále spojovány například geny pro výše zmíněné adipocytokiny (viz. 2.1.2.3). Byl potvrzen vztah mezi hypometylací imprintovaného *IGF2* a hypermetylací genu pro leptin a TNF a následný rozvoj obezity (Heijmans et al. 2008). Dalším rizikovým dědičným faktorem je polymorfismus G2548A v genu *LEP* (leptin), který byl prokázán ve studii na mongolské populaci. Tento polymorfismus je asociován nejen s vyšším BMI, ale také s vyšší hladinou glukózy v krvi a v konečném důsledku i s MetS (Dagdan et al. 2018). Viscerální obezita je také asociována s variantami v genu *ADIPOQ*, který kóduje adiponektin (Zhou et al. 2016). Také mutace *GNB3* kódující podjednotku G proteinu souvisí s rozvojem hypertenze a obezity (Siffert et al. 1999).

2.1.3.3 Genetická komponenta inzulinové rezistence

Také genetické pozadí inzulinové rezistence je složité a bylo identifikováno mnoho genů souvisejících s tímto fenotypem. Jsou to nejčastěji geny účastnící se metabolismu lipidů a glukózy, jako například *FTO*, *ADIPOQ*, *SREBF1*, *TCF7L2* a další. Do současnosti bylo

identifikováno více než 60 SNP asociovaných s diabetem mellitem 2. typu. (Mambiya et al. 2019).

Dalším příkladem genů, které se uplatňují v inzulínové signalizační kaskádě, a jejichž genetické varianty jsou asociovány s inzulínovou rezistencí, jsou geny pro regulaci inzulínových receptorů. Jedním z nich je *PC-1*, který kóduje transmembránový glykoprotein. Jeho polymorfnní varianta Q121 je riziková pro rozvoj inzulínové rezistence, a to nezávisle na BMI (Frittitta et al. 2001). Dalším slibným kandidátem je IRS, který je hlavním substrátem pro inzulínový receptor a reguluje tak inzulínovou signalizaci ve svalech a tukové tkáni. Varianta v jeho genu *IRS-1* ovlivňuje inzulínovou senzitivitu a také hladinu lipidů v krvi (Baroni et al. 2001; White 2002).

V neposlední řadě je inzulínová odpověď podmíněna nukleárním receptory PPAR (Receptory aktivované peroxizomovými proliferátory). Především pak polymorfismy izoformy γ byly již dříve asociovány s celou škálou metabolických poruch (Pap et al. 2016). Za povšimnutí stojí polymorfismus Pro12Ala, tato variantní alela je spojována se zmírněním inzulínové rezistence. Tento benefit je navíc u jedinců s touto alelou podpořen dietou bohatou na mononenasyčené mastné kyseliny. V tomto případě je tedy prokázána nutrigenetická interakce ve vztahu k diabetu mellitu 2. typu a s tím souvisejícího metabolického syndromu (Petrů, 2018).

2.1.3.4 Genetická komponenta dyslipidémie

Stejně jako u výše zmíněných komponent, i genetická determinace dyslipidémie je velice komplexní. Doposud bylo nalezeno přes 250 polymorfismů ovlivňující různé složky dyslipidémie (Surraka and et al 2016; Tabassum et al. 2019).

Změna v inzulínové odpovědi úzce souvisí i s hladinou lipidů v krvi. Mutace genů ovlivňujících inzulínovou rezistenci jsou často asociovány i s dyslipidémií. Jedním z příkladů jsou geny pro transkripční faktory, jako je *FOXC2* nebo *SREBP1*, tyto geny jsou asociovány s inzulínovou rezistencí a také koncentrací triacylglycerolů v krvi (Carlsson et al. 2004; Kotzka and Müller-Wieland 2004). Dalším příkladem je gen *FABP2*, jež nese genetickou informaci pro protein vázající mastné kyseliny, který se nachází na epiteliální buňkách v tenkém střevě. Polymorfnní varianta tohoto genu ovlivňuje inzulínovou rezistenci, intracelulární transport mastných kyselin a také hladinu lipidů v krvi (Feher Turkovic et al. 2012; Weiss et al. 2002).

Zvýšená prevalence MetS byla nalezena u synergie polymorfismů *ApoE* a *LRP1*. LRP1 (Low Density Lipoprotein Receptor 1) je receptor nacházející se v plazmatické membráně,

který ovlivňuje lipoproteinový metabolismus a umožňuje endocytózu. Jeho interakce s variantním genem pro apolipoprotein E zvyšuje koncentraci LDL a snižuje HDL (Vučinić et al. 2019).

Potvrzenou roli hrají také geny pro lipoproteinovou lipázu nebo CEPT a mnohé další (Skoglund-Andersson et al. 2003; Laakso 2004; Liu and Al 2011).

2.1.4 Epigenetika a metabolický syndrom

Epigenetické mechanismy, jako je modifikace histonů a chromatinu, DNA metylace a regulace genové exprese prostřednictvím malých RNA, se významně podílejí na rozvoji inzulinové rezistence, obezity, vaskulární dysfunkce a také zánětlivé odpovědi.

Příkladem takové epigenetické modifikace je metylace genu *FABP3* (Fatty Acid Binding Protein 3) nebo hypometylace genů cirkadiálních rytmů (například *BMAL1*, *CLOCK* a *PER2*), které jsou spojovány s obezitou a také metabolickým syndromem (Zhang et al. 2013; Milagro et al. 2012).

Zajímavým fenoménem je tzv. „šetrný fenotyp“, který předkládá hypotézu, že je možný přenos epigenetických mechanismů na potomka matky, která trpěla podvýživou. Vystavení hladovění v období před narozením či v brzkém dětství ústí ve zvýšený risk pro rozvoj MetS. Důvodem je snaha o adaptaci na nedostatek živin a epigeneticky jsou ovlivněny geny, které zodpovídají za metabolismus a ukládání lipidů. Socioekonomický vývoj ve 20. století s sebou mimo jiné přinesl nadbytek potravinových zásob, čímž se tyto genové modifikace stávají nevýhodnými. To vysvětluje obrovský nárůst v současnosti velmi prevalentních metabolických abnormalit (Siddiqui et al. 2019; Hales and Barker 2001).

Výše zmíněné příklady dokazují, jak složitá je genetická determinace metabolického syndromu. Toto onemocnění pokrývá široký výčet patologických stavů, zahrnuje mnoho metabolických drah, velké množství genů, jejichž vzájemné interakce a polymorfismy ho do jisté míry podmiňují. Klíčovým faktorem jsou ale i externí faktory, jako je fyzická aktivita, etnografický původ a také složení diety. Všechny tyto faktory a jejich vzájemné interakce činí toto již tak složité onemocnění ještě komplexnějším.

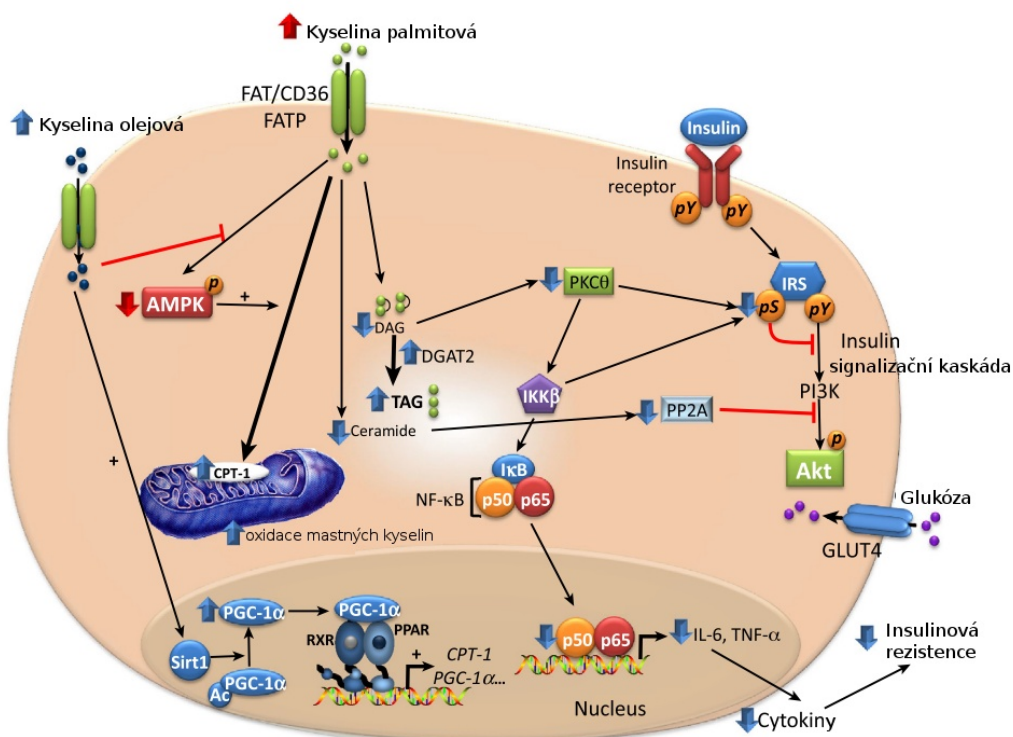
2.1.5 Dieta a metabolický syndrom

Obezita a inzulínová rezistence jsou hlavními rizikovými faktory pro rozvoj MetS a složení diety v tomto případě hraje klíčovou roli. Odpověď organismu na živiny závisí na jejich množství, skladbě, typu a také na jejich kombinaci.

2.1.5.1 Mastné kyseliny

Inzulínová senzitivizace je možná přes stimulaci receptorů aktivovaných peroxizomovými proliferátory γ (PPAR γ). Látek, které mají schopnost vázat se na tyto receptory, je celá řada. Mezi syntetické ligandy se řadí například thiazolidinediony, které se běžně využívají jako léčiva při farmakoterapii diabetu mellitu 2. typu (Nolan et al. 1994).

Ligandy pro PPAR γ ovšem můžeme najít i přirozeně se vyskytující v běžné stravě. Jsou to eikosanoidy, nasycené a nenasycené mastné kyseliny. Uvádí se, že nejsilnějším aktivátorem PPAR γ jsou polynenasycené mastné kyseliny vyskytující se v rostlinných a rybích olejích (Madsen et al. 2008).



Obrázek 3: Působení kyseliny olejové na metabolismus glukózy a mastných kyselin (Palomer et al. 2017)

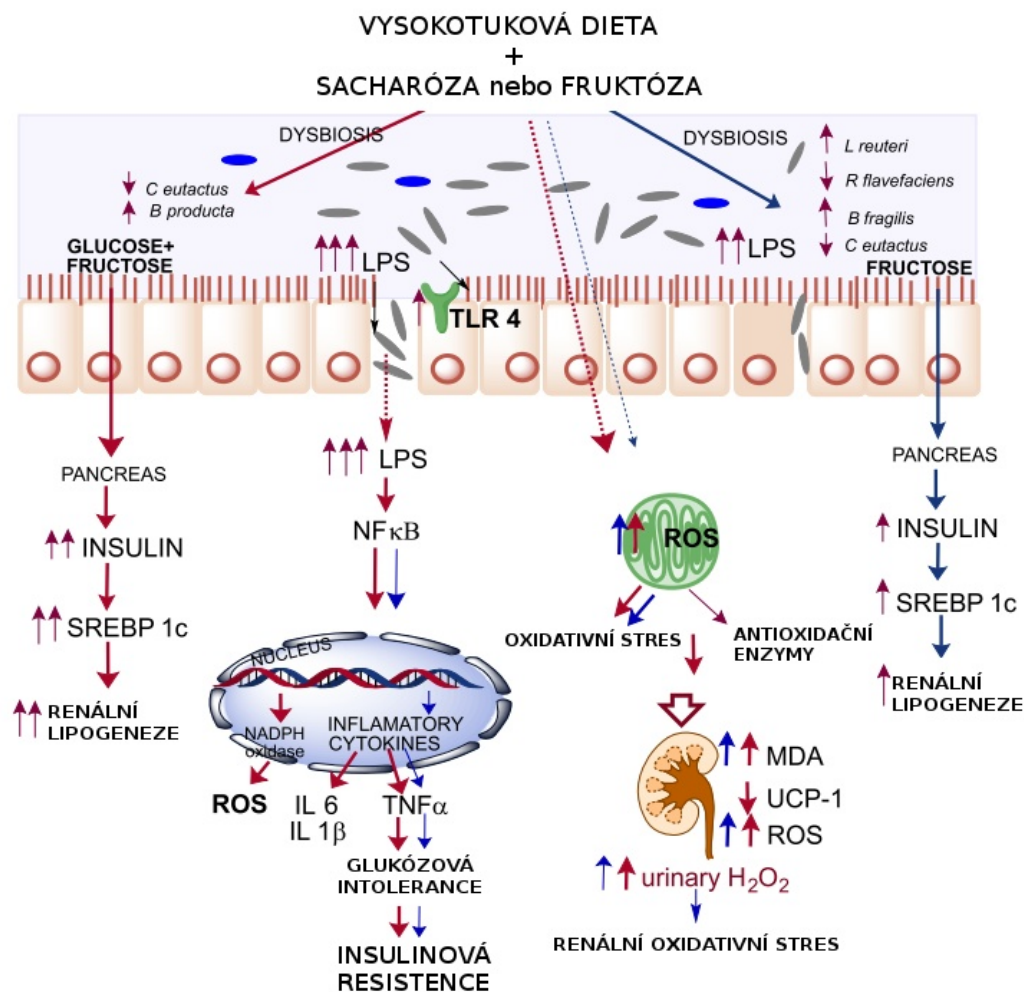
Kyselina olejová, která patří mezi mononenasyčené mastné kyseliny, podporuje β oxidaci mastných kyselin, čímž dochází k redukci tvorby diacylglycerolů, ceramidů a lipidy se ukládají ve formě méně škodlivých triacylglycerolů. Na druhou stranu, působením nasycených mastných kyselin, jako je například kyselina palmitová, dochází ke snížení aktivity adenosinmonofosfát-aktivované protein kinázy (AMPK) a následkem je útlum β oxidace. Kyselina olejová má proti tomuto opačný účinek. Zvyšuje aktivitu koaktivátorů PPAR γ a tím podporuje expresi těchto receptorů. Dále snižuje aktivitu protein kinázy C (PKC), což vede ke snížené expresi cytokinů a úpravě inzulínové senzitivity (Palomer et al. 2017).

Pozitivní účinky má také rybí olej, jehož složkou je kyselina eikosapentaenová, která je zástupcem omega-3-nenasycených mastných kyselin (Roberta et al. 2020). Vhodná je také dieta s obsahem polyfenolů. Z výsledků studií tedy vyplývá, že strava bohatá na nenasycené mastné kyseliny, tedy typická středomořská dieta, kladně ovlivňuje metabolismus lipidů a glukózy. Dochází také ke změně ve střevním mikrobiomu a následnému zmírnění kardiometabolických rizik (Vetrani et al. 2020).

Naopak vysokotučná dieta (více než 50 kJ % z tuků) s vyšším podílem nasycených mastných kyselin a cholesterolem indukuje inzulínovou rezistenci, dyslipidémii a obezitu (Roberta et al. 2020; Vetrani et al. 2020).

2.1.5.2 Sacharidy

Vysoké procento sacharidů v dietě (okolo 70 kJ %), mezi jejíž hlavní komponenty patří sacharóza a fruktóza, představuje vyšší riziko rozvoje MetS, včetně hyperglykémie, hypertenze, akumulace viscerálního tuku a kardiovaskulárních chorob (Lozano et al. 2019). Chronická konzumace sacharózy způsobuje také hyperlipidémii a nealkoholové ztučnění jater, taktéž typické pro MetS (Cruz Souza et al. 2020; Sun et al. 2019).



Obrázek 4: Působení vysokotukové a vysokosacharidové diety na metabolismus (Rosas-Villegas et al. 2017)

Dieta s velkým obsahem tuků a sacharidů modifikuje střevní mikrobiom a zvyšuje paracelulární transport lipopolysacharidů, které působí jako endotoxin a vyvolávají tak stav chronického zánětu. Dochází také ke zvýšení renální lipogeneze a produkci zánětlivých markerů, což vede ke glukózové intoleranci a inzulínové rezistenci. U sacharózy, která je štěpena na glukózu a fruktózu, je tento trend v porovnání s fruktózou ještě výraznější. Oba typy diet také zvyšují produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a renální oxidativní stres (Rosas-Villegas et al. 2017).

2.2 Genetická analýza komplexních onemocnění

Komplexní onemocnění, mezi která patří i metabolický syndrom, jsou typická polygenní dědičností, genetickou heterogenitou a vzájemnou interakcí genetických faktorů s aspekty prostředí. Ke genetické analýze těchto onemocnění se v současnosti přistupuje z genomického pohledu, který je více komplexní a dává nám ucelenější přehled o genetické komponentě a jejích interakcích.

2.2.1 Celogenomové asociační studie (GWAS)

Celogenomové asociační studie mají za cíl vyhodnotit genetické predispozice k danému onemocnění. GWAS jsou založeny na principu identifikace jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v rámci celého genomu, které mohou zvyšovat nebo snižovat riziko onemocnění. Porovnáním frekvence těchto rizikových lokusů u kontrolní a případové skupiny je pak možné nalézt souvislost s daným fenotypem. Lokusy, které jsou asociovány s komplexními chorobami, mají často pleiotropní efekt, tzn. ovlivňují více fenotypových projevů. To může být do jisté míry omezením při interpretaci výsledků těchto studií, neboť s narůstajícím množstvím polymorfismů dochází také k vyšší pravděpodobnosti falešně pozitivní identifikace asociací mezi genem a fenotypem. Proto je nutné použití robustních matematických modelů, které do značné míry korigují chybu mnohočetného porovnávání.

Při validaci výsledků mají nezastupitelnou roli modelové organismy a interakce s environmentálními faktory (Civelek and Lusic 2014; Abou Ziki and Mani 2017).

GWAS využívá metody případ-kontrola, která zahrnuje skupinu nemocných a skupinu zdravých jedinců. Pokud jsou tyto studie prováděny na menších populacích, například v rámci jedné národnosti, pak mohou vznikat falešně pozitivní výsledky. Je proto potřeba tyto studie replikovat na různých populacích, aby se předešlo technickým chybám a systémovému zkreslení (Lyon et al. 2007). V poslední době nejsou ale vzácností studie čítající kohorty statisíců či milionů jedinců (Wei et al. 2020; Park et al. 2020; Goulart et al. 2009) .

2.2.2 Vazebná analýza (QTL mapování)

Mapování lokusů kvantitativních znaků (QTL, z angl. Quantitative Trait Locus) je další metodou pro určení oblastí genomu, které podmiňují polygenně determinovaný fenotyp. Oblast našeho zájmu, tedy QTL, je vázáno v určité vzdálenosti od molekulárního markeru, kterým mohou být mikrosatelity, inserční nebo deleční polymorfismy (in-del) nebo jednonukleotidové polymorfismy. Predikce závisí na vzdálenosti těchto dvou lokusů, čím blíže jsou u sebe, tím spíše se alely segregují společně, neboť je menší pravděpodobnost, že se budou rekombinovat (Georges 1997).

Při genotypizaci se využívá mnoha anonymních markerů, které jsou rozesety po celém genomu. V současnosti se k identifikaci QTL přistupuje buď metodou kandidátních genů nebo pozičního klonování.

2.2.2.1 Analýza kandidátních genů

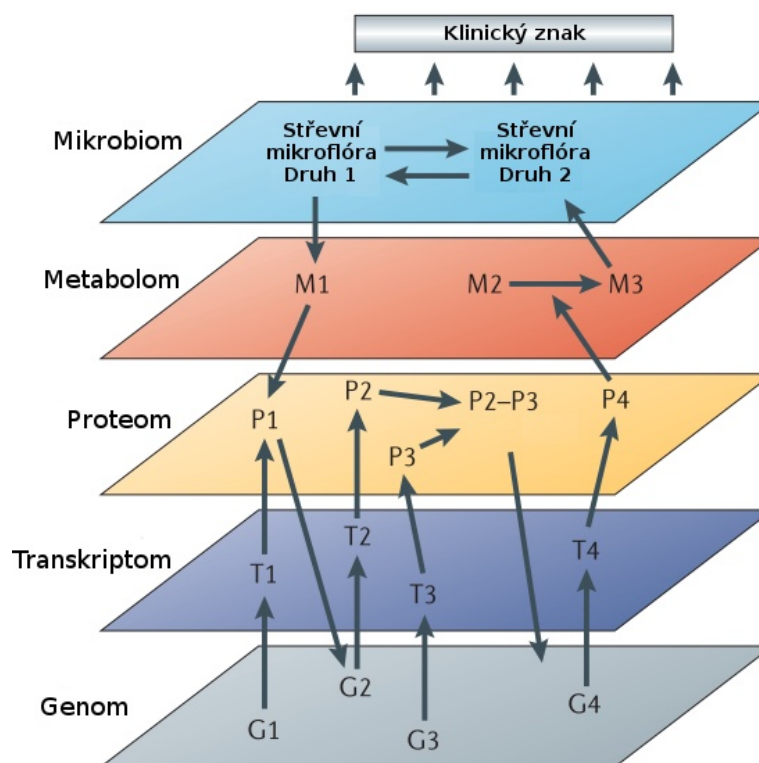
Před příchodem genomických metod se k výzkumu multifaktoriálních onemocnění často využívalo asociační analýzy kandidátních genů. Zkoumán byl vztah mezi onemocněním a jednonukleotidovými polymorfismy funkčních genů. Tyto geny pak byly podrobeny detailní molekulární charakteristice. Za tímto účelem byly prováděny studie typu případ-kontrola, asociační studie v rodinách nebo kohorty (Fathi Dizaji 2018). Data získaná z těchto studií ovšem nemohla zcela objasnit vzájemné genové interakce v asociaci s vnějšími faktory.

2.2.2.2 Poziční klonování

Novějším přístupem založeným na QTL je metoda pozičního klonování, která zahrnuje sérii molekulárních technik s cílem identifikovat kauzální geny. Poziční klonování začíná určením kandidátního genu na základě chromozomové lokalizace a je následováno analýzou jeho polymorfismů. Dalším krokem je definice kauzálního vztahu mezi genovým polymorfismem a aberujícím fenotypem. To je často prováděno za pomoci *in vitro* testů nebo experimentálních modelových organismů (Puliti et al. 2007).

2.2.3 Systémová genetik

Dalším, ještě komplexnějším, přístupem je systémová genetik. Ta sdružuje data napříč různými úrovněmi, od genů, přes transkripty a proteiny, až po metabolity.



Obrázek 5: Přístup systémové genetiky (Civelek and Lusic 2014)

Výhodou tohoto přístupu je, že zvládá analyzovat mnoho molekulárních interakcí, které jsou relevantní k danému onemocnění. Dochází tak k propojení molekulárních úrovní (viz Obrázek 5), které spolu vzájemně interagují.

Strategie systémové genetiky spočívá v odchýlení systému (například dietou nebo farmakoterapií) a sledováním jeho odpovědi. Poté se shromáždí data a vytvoří matematické modely, které daný systém charakterizují (Civelek and Lusic 2014).

2.2.3.1 Genom

Prvním stupněm systémové genetiky je genom. Ten sdružuje všechny geny daného organismu. Pomocí celogenomové sekvenace je pak možné identifikovat individuální kompletní DNA sekvenci, která zahrnuje i nekódující oblasti. Interpretace těchto dat je klíčová pro pochopení daného funkčního fenotypu (Lappalainen et al. 2013). Za tímto účelem je prováděna sekvenace genomů modelových organismů, přičemž jedním z důležitých modelových organismů v experimentální biologii je právě potkan.

V roce 2004 vzniknul The Rat Genome Sequencing Project (RGSC), který již na začátku svého vzniku identifikoval 90% genomové sekvence potkaního kmene Brown Norway (Gibbs et al. 2004). Tento projekt kombinuje metodu BAC (Bacterial Artificial Chromosome) sekvenování a Whole-genome shotgun. Klíčovou metodou pro sekvenaci DNA jsou také metody využívající jednonukleotidové polymorfismy (Twigger et al. 2008).

Na základě tohoto projektu vznikl RGSC Genome Assembly a množství dat v rámci této databáze stále roste [zdroj: Rat Genome Database (RGD), <http://rgd.mcw.edu>, přístup dne 7.7.2020]

2.2.3.2 Transkriptom

Dalším stupněm systémové genetiky je transkriptom, který zachycuje profil genové exprese v daném čase a místě (například konkrétní tkáni). Genová exprese, jejíž analýza se provádí za pomoci microarray nebo RNA-seq, je základním pilířem systémové genetiky.

Oblasti genomu asociované s transkriptomem se nazývají lokusy regulující genovou expresi (eQTL). eQTL jsou podle vzdálenosti od genu, který regulují, rozdělovány na dva typy. Jako *cis* eQTL se označují pokud se lokusy nacházejí ve vzájemné blízkosti (do 1Mb), v opačném případě jde o *trans* eQTL, jejichž lokusy jsou vzdálené, případně se nacházejí na jiném chromozomu (Nica and Dermitzakis 2013).

Studie na myších, potkanech a lidských buňkách odhalily, že expresi až 30% genů ovlivňuje právě eQTL (Van Nas et al. 2010; Romanoski et al. 2010). Stejně tak celogenomové asociační studie potvrzují, že většina SNP se nachází uvnitř oblastí nekódující DNA a tedy mimo oblast kódující proteiny (Schaub et al. 2012). Z toho vyplývá, že komplexní onemocnění jsou daleko více podmíněny právě genovými variantami (SNP, in-del, mikrosatelity), které mají vliv na genovou expresi.

2.2.3.3 Proteom

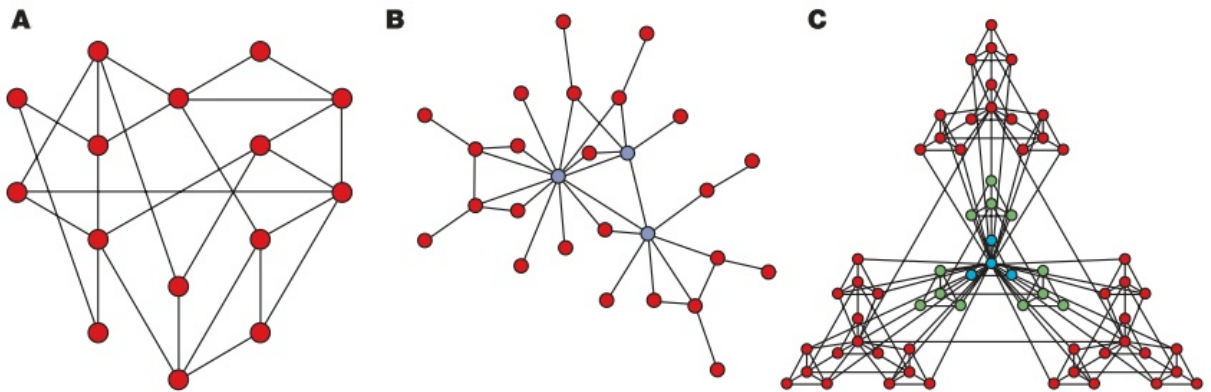
Detailní analýza proteinů a jejich modifikací je dalším krokem v systémové genetice, který může objasnit souvislost mezi genotypem a fenotypem. Ke kvantifikaci a analýze se využívá hmotnostní spektrometrie nebo immunoassay. Problémem ovšem je, že lze tímto způsobem analyzovat jen malou frakci proteinů. Varianty v transkriptu vysvětlují a korespondují jen s malou částí proteomu, neboť hladina proteinů se mění v závislosti na potřebách daného organismu, přestože genetická výbava zůstává neměnná (Ghazalpour et al. 2011; Foss et al. 2007). Vliv má také velké množství posttranslačních modifikací, které způsobují vysokou heterogenitu mezi proteiny (Krishna and Wold 1993).

2.2.3.4 Metabolom

Metabolom zahrnuje veškeré metabolity, které jsou konečným produktem buněčných procesů a jsou tak na samém konci „systému“. Komplexní analýzou metabolitů se zabývá vědní obor metabolomika. Ta využívá metody nukleární magnetické resonance a hmotnostní spektrometrie (Patti et al. 2012). Metabolomické profilování je tak důležitou součástí studií interakcí mezi genetickou a environmentální komponentou u komplexních onemocnění.

2.2.3.5 Teorie sítí

Snaha o integraci dat do matematických modelů s sebou přinesla tzv. „teorii sítí“. Ta se snaží o modelování sítí, které dávají do souvislosti vztahy mezi molekulárními fenotypy a graficky znázorňují interakce mezi molekulárními znaky.



Obrázek 6: Příklady sítí (Barabási and Oltvai 2004)

Molekulární znaky jsou zde prezentovány jako uzly a jejich vzájemné propojení pak určuje, jak mezi sebou vzájemně interagují. Takto vytvořené sítě mohou mít různou topologii.

(A) Náhodná síť je tvořena N uzly, které jsou propojeny s pravděpodobností p .

(B) Bezškálová síť je nezávislá na počtu uzlů. To znamená, že její struktura zůstává neměnná i při větším množství uzlů. Pravděpodobnost, že uzly jsou spojeny je vyšší než u náhodné sítě.

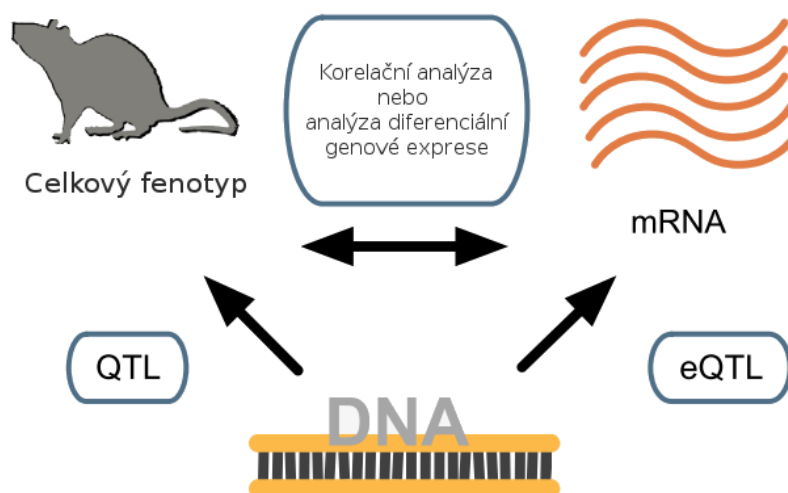
(C) Hierarchická síť má centrální uzel, který je spojován s uzly v nižším stupni hierarchie. Tvoří tak síť, která využívá bezškálové topologie a klastrování uzlů.

Pokud je uzel nějakým způsobem ovlivněn (například mutací), mění se struktura sítě, což je pak možné pozorovat i na klinické úrovni. Kombinace dat z vrstev systémové genetiky a tvorba sítí dramaticky zvyšují možnost porozumění buněčné dynamice a funkci. Je tedy vhodnou metodou, která by mohla rozehřít pozadí komplexních onemocnění (Barabási and Oltvai 2004; Almaas 2007).

2.2.3.6 Potkan jako modelový organismus pro systémovou genetiku

V porovnání s jinými modelovými organismy mají hlodavci velmi podobné genetické a fenotypové vlastnosti jako člověk. Nejvhodnějším kandidátem pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních chorob je potkan, neboť oproti myšimu modelu umožňuje přesnější analýzu klinických a buněčných fenotypů souvisejících s metabolickými drahami (Aitman et al. 2016; Gauguier 2016).

Zároveň bylo u potkana velmi úspěšné QTL mapování. V současnosti bylo ve spojitosti s obezitou a metabolickým syndromem u potkana identifikováno 705 QTL a 3503 genů (u člověka 809 QTL a 3760 genů) [zdroj: Rat Genome Database (RGD), <http://rgd.mcw.edu>, přístup dne 22.3.2020]. Mnoho genů, které u potkana vykazovaly asociaci s MetS, jsou také konzervovány v lidském genomu (Gauguier 2016).



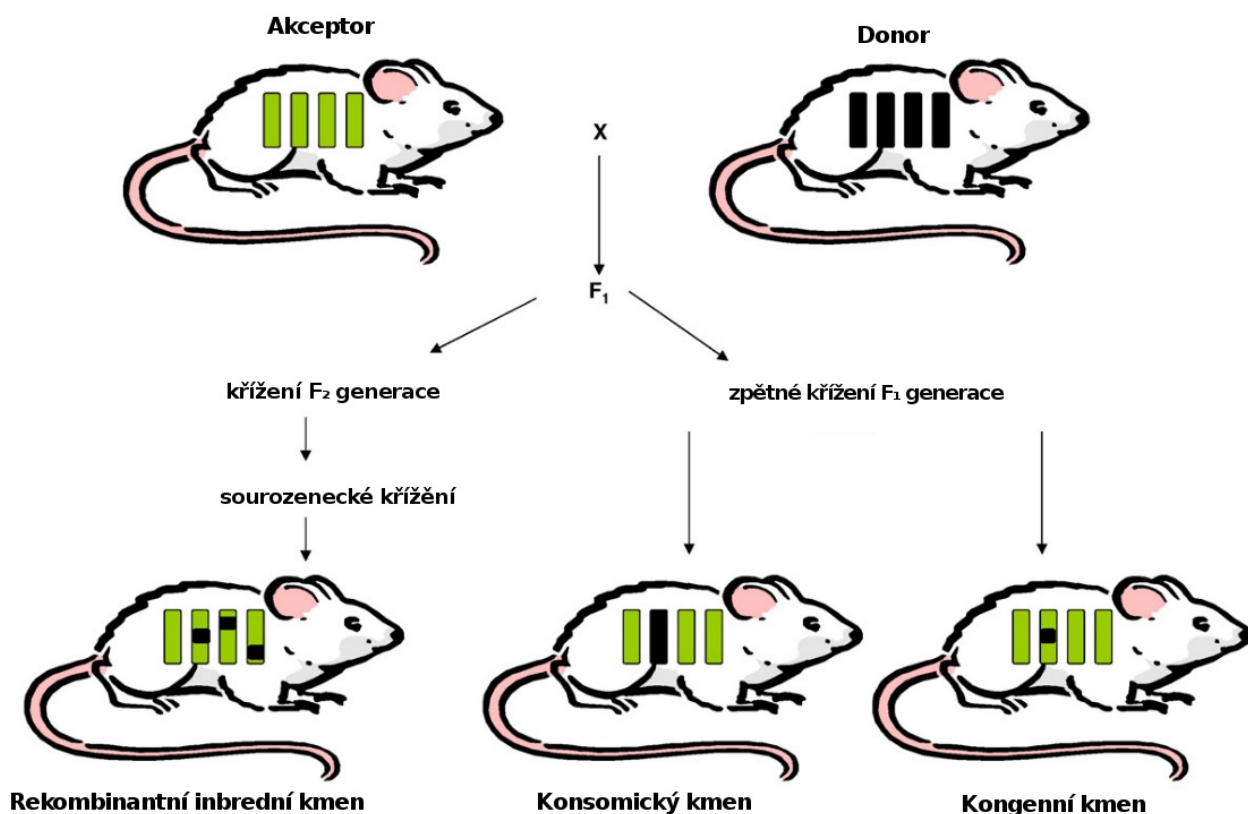
Obrázek 7: Strategie systémové genetiky u potkana (Moreno-Moral and Petretto 2016)

Za pomoci QTL nebo eQTL dat je možné identifikovat geny související s určitým fenotypem u potkaního modelu.

Potkan má také poměrně krátký generační čas, dostatečné množství potomstva a je možné na něm testovat vlivy vnějšího prostředí. S jeho genomem se dá manipulovat řadou nástrojů genového inženýrství, jako jsou například TALENy (Transcription Activator-like Effector Nucleases), zinc-finger nukleázami nebo pomocí CRISPR-Cas9 (Mashimo 2013; Yoshimi et al. 2014).

Další nespornou výhodou potkaního modelu je existence množství specializovaných inbredních kmenů, které byly vyšlechtěny tak, aby napodobovaly lidské onemocnění. V

souvislosti s obezitou, diabetem, hypertenzí a dyslipidémií existuje již 179 inbredních potkaních kmenů [zdroj: Rat Genome Database (RGD), <http://rgd.mcw.edu>, přístup dne 22.3.2020]. Těchto kmenů lze dosáhnout metodami cíleného křížení.



Obrázek 8: Princip šlechtění rekombinantních inbredních, konsomických a kongenních kmenů (Delles et al. 2010)

Kongenní kmene jsou vyvářeny vnesením části chromozomu jednoho inbredního kmene na genetické pozadí jiného inbredního kmene. Vznikne tak kmen s diferenciálním segmentem, který se nachází na jednom z chromozomů. V případě, že mají tyto kmene rozdílný fenotyp, lze pak usuzovat, že v diferenciálním segmentu se nacházejí geny, které determinují daný znak (Markel et al. 1997).

Konsomické kmene vznikají introgresí celého chromozomu z jednoho inbredního kmene (donor) na izogenní pozadí jiného kmene (akceptor). Diferenciální segment je tedy představován celým chromozomem.

Rekombinantní inbrední kmeny jsou genetickou mozaikou dvou původních kmenů (donor + akceptor) a jsou homozygotní ve všech svých lokusech (Broman 2005). F₁ a F₂ generace vznikají příbuzenským křížením. Z F₂ generace je vybrán jeden pár progenitorů, ten je následně křížen a po více než 20 generacích, které vznikají tímto sourozeneckým křížením, dochází k ustálení rekombinantních inbredních kmenů (Siracusa et al. 1989; Jirout et al. 2003).

Díky probádanosti genetického pozadí potkana, množství inbredních modelových kmenů, genetické a evoluční příbuznosti s člověkem, je potkan vhodným modelovým organismem, který nám poskytuje komplexní náhled na multifaktoriální onemocnění.

3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je zmapovat genetické pozadí dvojité kongenního kmene potkana BN-*Lx*.SHR4. V neposlední řadě si práce klade za cíl definovat vliv diety s různým obsahem tuků a sacharidů a nutrigenetických interakcí, které působí na metabolické dráhy, které jsou asociovány s metabolickým syndromem.

Dílčí cíle práce jsou následující:

1. Genetické zmapování diferenciálního segmentu u dvojité kongenního kmene potkana BN-*Lx*-SHR4.
2. Porovnání metabolických a transkriptomických profilů potkaních kmenů BN-*Lx*, a BN-*Lx*-SHR4 za podmínek standardní a vysokosacharóзовé diety.
3. Identifikace potenciálních nutrigenetických interakcí uplatňujících se u tohoto modelu metabolického syndromu.

4 Materiál a metody

4.1 Modelové organismy

4.1.1 Experimentální modelové kmeny laboratorního potkana

Veškeré experimenty a zacházení s modelovými kmeny laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) bylo v souladu s platnou národní a evropskou legislativou na ochranu zvířat. Všechny pracovní postupy v této práci, které zahrnují manipulaci se zvířaty, byly schváleny Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Samci potkanů byli chováni v podmínkách s kontrolovanou teplotou a vlhkostí s cyklem 12 hodin světlo / 12 hodin tma a měli přístup k vodě a stravě *ad libitum*. Ve 4. měsíci věku byli usmrceni a byl proveden odběr tkání pro následnou analýzu.

Všechny níže uvedené kmeny (kromě nově vytvořeného dvojité kongenního kmene BN-Lx.SHR4) jsou anotované v Rat Genome Database (RGD), <https://rgd.mcw.edu/> podle specifického RGD ID nebo podle zkratky jejich názvu – například BN/Cub (Brown Norway/ Charles University, Institute of Biology).

4.1.1.1 Spontánně hypertenzní kmen potkana (SHR, RGD ID 61000)

V roce 1963 v Japonsku vzniknul spontánně hypertenzní kmen potkana selektivním křížením hypertenzního páru potkanů z kmene Wistar. Po inbredním ustálení tento kmen vykazuje fenotyp zahrnující řadu metabolických abnormalit jako je hypertenze, dyslipidémie, inzulinová rezistence a obezita (Okamoto and Kyuzo 1963). Na jeho 4. chromozomu byla zmapována deleční mutace genu *Cd36*, který kóduje translokázu mastných kyselin (Aitman et al. 1999). *Cd36* je důležitým proteinem účastnícím se metabolismu mastných kyselin s dlouhým řetězcem, neboť jim zprostředkovává vstup do buňky. Delece v jeho genu pak způsobuje, že se téměř neexprimuje, čímž dochází k sníženému vychytávání a zpomalení metabolismu mastných kyselin (Bonen et al. 2004). Nicméně řada vazebných a asociačních studií ukázala, že genetická predispozice pro metabolický syndrom je u SHR polygenní a na chromozomu 4 i mimo oblast genu *Cd36* byly mapovány signifikantní asociace s různými aspekty metabolického syndromu (Hodúlová et al. 2014).

4.1.1.2 Kmen Brown Norway (BN/Cub, RGD ID 737899)

Brown Norway byl prvním potkaním kmenem využívaným k laboratorním pokusům (Gibbs et al. 2004). Inbrední kmen Brown Norway vznikl selektivním křížením z divokého kmene potkana, který byl odchycen na počátku 20. století v USA. Od roku 1964 je tento inbrední kmen chován na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK. Jeho fenotyp nevykazuje spontánně zvýšenou hladinu cirkulujících volných mastných kyselin, triacylglycerolů a glukózy v krvi. Je proto vhodným kontrolním kmenem pro studium metabolických onemocnění. V roce 2004 byl plně osekvenován jeho genom (Gibbs et al. 2004).

4.1.1.3 Polydaktylní kmen potkana (PD/Cub, RGD ID 728161)

Progenitorem tohoto kmene je Wistar potkan, u kterého se rozvinul polydaktylní luxační syndrom, který byl způsobený spontánní mutací genu *Lx*. Tento syndrom se projevuje preaxiální polydaktylií a luxací zadních končetin (Křeh 1975). Od roku 1969 je chován na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a je vysoce inbrední po křížení více než 150 generací.

Polydaktylní kmen potkana má ve svém fenotypu hypertriglyceridemii a inzulínovou rezistenci a je tedy taktéž považován za modelový organismus pro metabolický syndrom (Vrána et al. 1993; Šedová et al. 2000).

4.1.1.4 Kongenní kmen (BN-*Lx*, RGD ID 61117)

Vnesením úseku osmého chromozomu kmene PD/Cub včetně mutantního genu *Lx*, na genomické pozadí BN/Cub vzniknul kongenní kmen BN-*Lx*. Tento vnesený diferenciální úsek nese společně s malformační mutací také geny, které ovlivňují metabolismus lipidů a sacharidů. Fenotyp BN-*Lx* zahrnuje hyperlipidémii a glukózovou intoleranci (Šeda et al. 2002).

4.1.1.5 Dvojitě kongenní kmen (BN-*Lx*.SHR4)

Metodou zpětného křížení (Marker-assisted Backcross) byl vytvořen dvojitě kongenní kmen BN-*Lx*.SHR4. Proces derivace tohoto nového, dvojitě kongenního kmene lze shrnout následovně: Po křížení kmenů progenitorů, tedy SHR a BN-*Lx*, byli vzniklí F₁ hybridi opakovaně zpětně kříženi s BN-*Lx*. Následně byl diferenciální segment zafixován křížením

heterozygotů a výběrem jejich potomků, kteří zdělili cílený segment chromozomu 4 v homozygotním stavu. Výsledný kmen BN-*Lx*.SHR4 má na genetické pozadí kongenního kmene BN-*Lx* vnesenu část genetické informace od kmene SHR. BN-*Lx*.SHR4 tedy nese úsek 8. chromozomu původem od BN-*Lx* (resp. PD/Cub) a navíc má na 4. chromozomu diferenciální segment, který je SHR původu.

Podrobná genetická, metabolická a transkriptomická charakterizace BN-*Lx*.SHR4 je předmětem této diplomové práce.

4.2 Diety

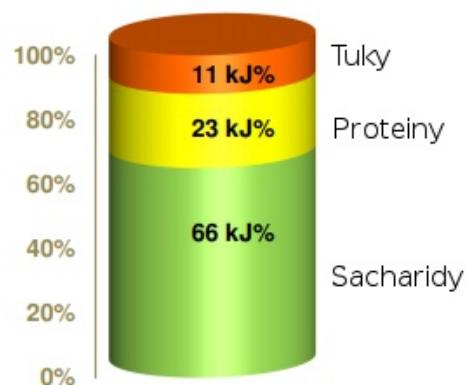
Samci potkanů zvolení dle příslušnosti dvou kmenů – BN-Lx.SHR4 ($n=12$) a BN-Lx ($n=12$) byli do 4. měsíce krmeni standardní dietou (viz 4.2.1). Po dosažení 4. měsíce věku byli potkani každého z kmenů náhodně rozděleni na skupinu kontrolní ($n=6$ /kmen), která byla nadále krmena standardní dietou, a skupinu experimentální ($n=6$ /kmen), které byla 14 dní podávána dieta vysokosacharózová (viz 4.2.2).

4.2.1 Standardní dieta (STD)

Potkani byli krmeni peletami s definovaným množstvím sacharidů, tuků, bílkovin a mikroživin. Krmivo bylo dodáno firmou Ssniff Spezialdiäten GmbH, která se specializuje na experimentální diety pro laboratorní modelové organismy.

Standardní kontrolní dieta pro potkany obsahuje 66 % kJ sacharidů, 23% kJ proteinů a 11% kJ tuků z celkového denního energetického příjmu. Během studie měli potkani volný přístup k vodě a stravě. Konkrétní složení diety je následující:

| Složení | Množství [%] |
|--------------------|--------------|
| Sušina | 95,2 |
| Protein (N x 6,25) | 20,8 |
| Tuk | 4,2 |
| Vláknina | 5,0 |
| Popel | 5,6 |
| Extrakt bez N | 59,4 |
| Škrob | 46,8 |
| Sacharóza | 10,8 |



Tabulka 2: Složení STD Obrázek 9: Procentuální obsah základních živin v STD (© Ssniff Spezialdiäten GmbH)

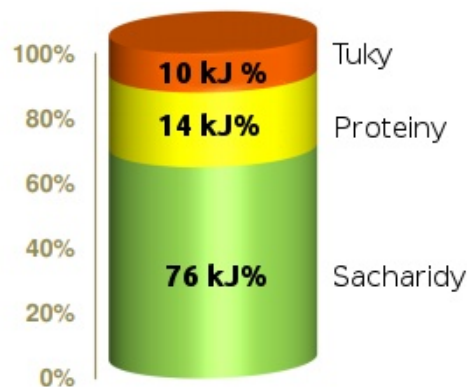
| Minerály | [%] | Aminokyseliny | [%] | Vitamíny | per kg |
|------------|----------|---------------|------|------------------------------|---------------|
| Calcium | 0.92 | Lysine | 1.75 | Vitamin A | 15,000 IU |
| Phosphorus | 0.65 | Methionine | 0.75 | Vitamin D ₃ | 1,500 IU |
| Ca / P | 1.41 : 1 | Cystine | 0.29 | Vitamin E | 150 mg |
| Sodium | 0.20 | Met+Cys | 1.04 | Vitamin K (as MNB) | 20 mg |
| Magnesium | 0.23 | Threonine | 0.93 | Thiamine (B ₁) | 26 mg |
| Potassium | 0.97 | Tryptophan | 0.27 | Riboflavin (B ₂) | 16 mg |
| | | Arginine | 0.83 | Pyridoxine (B ₆) | 16 mg |
| | | Histidine | 0.64 | Cobalamin (B ₁₂) | 30 µg |
| | | Valine | 1.47 | Nicotinic acid | 49 mg |
| | | Isoleucine | 1.19 | Pantothenic acid | 55 mg |
| | | Leucine | 2.10 | Folic acid | 16 mg |
| | | Phenylalanine | 1.10 | Biotin | 300 µg |
| | | Phe+Tyr | 2.22 | Choline | 920 mg |
| | | Glycine | 0.42 | | |
| | | Glutamic acid | 4.76 | Stopové prvky | per kg |
| | | Aspartic acid | 1.57 | Iron | 168 mg |
| | | Proline | 2.43 | Manganese | 98 mg |
| | | Serine | 1.27 | Zinc | 67 mg |
| | | Alanine | 0.64 | Copper | 14 mg |
| | | | | Iodine | 1.2 mg |
| | | | | Selenium | 0.2 mg |

Obrázek 10: Složení mikroživin v dietě (©Ssniff Spezialdiäten GmbH)

4.2.2 Vysokosacharózová dieta (HSD)

U vysokosacharózové diety byla složka škrobu nahrazena sacharózou. Energetické rozložení základních živin a mikroživin je podobné jako u standardní diety. HSD vznikla modifikací experimentální STD podle Fábry (1959) v IKEM (Fábry et al. 1968).

| Složení | Množství [%] |
|-----------------------|--------------|
| Sacharóza | 70,0 |
| Sušené pивní kvasinky | 9,0 |
| Sušené mléko | 9,0 |
| Kasein | 6,0 |
| Vojtěška | 3,3 |
| Sůl | 1,8 |
| Olej z tresčích jater | 0,9 |



Tabulka 3: Složení HSD (Fábry et al. 1968) Obrázek 11: Procentuální obsah základních živin v HSD

4.3 Molekulární metody

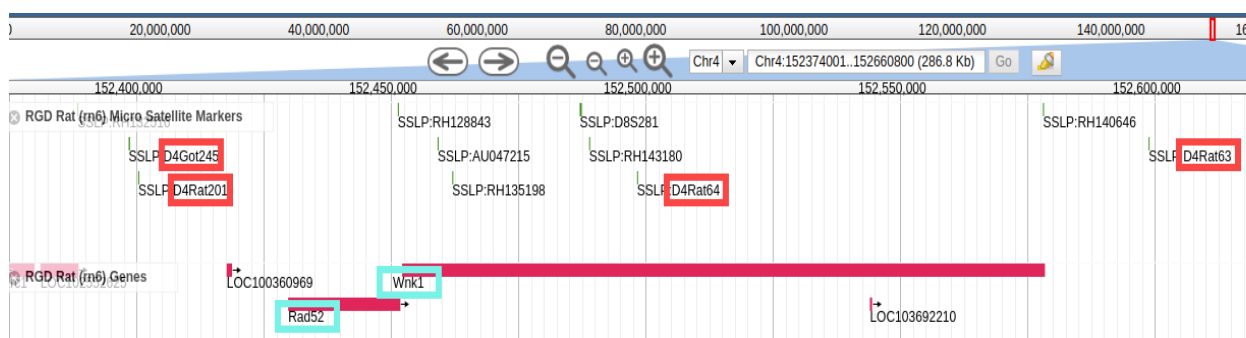
4.3.1 Genotypizace

4.3.1.1 Izolace DNA

Na konci experimentu byl odebrán vzorek tkáně z konce ocasu nebo z jater potkana. Pro rozrušení a natrávení tkáně byl nejprve přidán k odebranému vzorku trávící pufr (pH 8) a proteináza K. Vzorek byl poté pročištěn od proteinů pomocí fenol-chloroformu (Roti® Fenol/Chloroform/Isoamylalkohol). Pro precipitaci DNA byl přidán octan sodný a 96% etanol, a následně po centrifugaci 70% etanol. Nakonec byl k vysušenému vzorku přidán pufr (ředění 1:100, Sigma® TRIS EDTA Buffer).

4.3.1.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

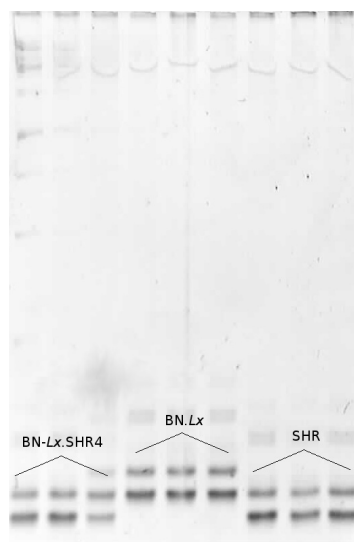
Genotypizace kmene BN-*Lx*.SHR4 byla založena na metodě PCR s využitím markerů polymorfních mezi progenitorovými kmeny. Primery byly zvoleny podle mikrosatelitních markerů SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) z Rat Genome Database (<https://rgd.mcw.edu/>) a vyrobeny firmou Integrated DNA Technologies (Belgie). K 1 µl vzorku bylo přidáno 14,5 µl master mixu obsahujícího ddH₂O, betain, dNTP, pufr, Mg²⁺, forward + reverse primer a Taq polymerázu (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Podmínky (například množství přidaného primeru) pro PCR byly optimalizovány podle konkrétních primerů. PCR reakce proběhly v přístroji Sensoquest Labcycler (SensoQuest, SRN).



Obrázek 12: Metoda vizualizace pozice SSLP markerů (červeně) nacházejících se na 4. chromozomu potkana a geny obsažené v daném úseku (modře), [zdroj: RGD Rat (rn6), <http://rgd.mcw.edu>, přístup dne 4.4.2020]

4.3.1.3 Gelová elektroforéza

Produkty PCR byly separovány na polyakrylamidovém (7-10% - optimalizováno podle velikosti konkrétního PCR produktu) gelu. Jako marker byl využit GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Pro vizualizaci produktu pod ultrafialovým světlem byl využit ethidium bromid. Detekce proběhla s pomocí přístroje G:Box (Syngene, UK).



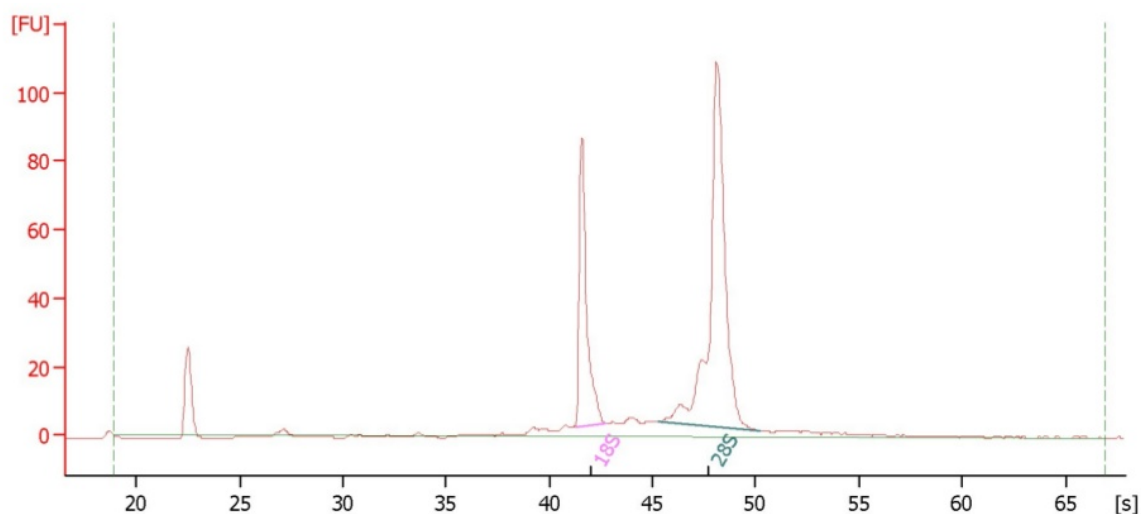
Obrázek 13: Vizualizace PCR (marker Eno2) produktu po proběhlé polyakrylamidové elektroforéze

Je patrné, že všechny testované vzorky BN-Lx.SHR4 mají PCR produkt o stejné délce, jako progenitorový kmen SHR; tento marker je tedy v dvojité kongenním kmenu SHR původu.

4.3.2 Analýza genové exprese

4.3.2.1 Izolace RNA

RNA byla nejprve izolována za pomoci TRIzol Reagent (Invitrogen, CA, USA). Extrahovaná RNA byla purifikována za pomoci RNeasy Mini Kit (Qiagen, CA, USA) podle protokolu, který byl doporučen výrobcem. Kvantitativní a kvalitativní analýza RNA pro stanovení kvality byla provedena systémem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, CA, USA).

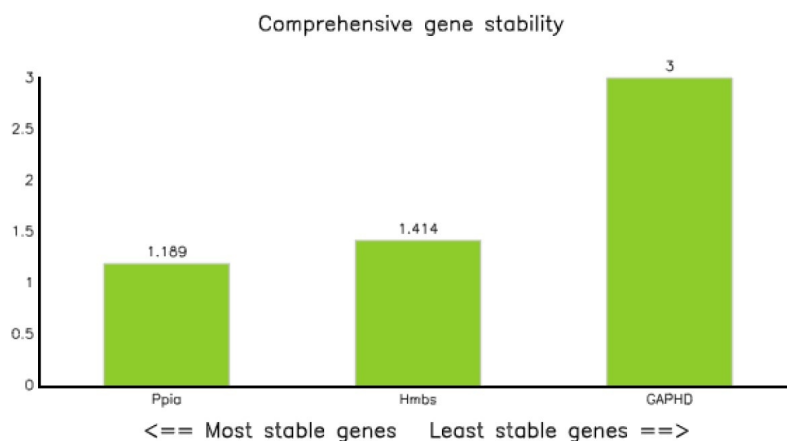


Obrázek 14: Zhodnocení kvality RNA pomocí Agilent 2100 Bioanalyzer

4.3.2.2 Kvantitativní polymorázová řetězová reakce (qPCR)

Pro validaci dat z microarray byla provedena qPCR. Nejprve proběhl výběr referenčního genu z následujících možností: *Hmbs* (Porphobilinogen Deaminase), *Ppia* (Peptidylpropyl Izomerase A) a *Gapdh* (Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase). Pro zhodnocení genové stability byl vybrán *Ppia* jako referenční gen. Z celkové RNA (2 µg) byla syntetizována cDNA reverzní transkripcí s náhodnými primery za pomoci SuperScript III cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). qPCR byla provedena s využitím TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

Genes Geomean of ranking values
Ppia 1.19
Hmbs 1.41
GAPHD 3.00



Obrázek 15: Zhodnocení stability vybraných referenčních genů pomocí RefFinder (Xie et al. 2012)

4.3.2.3 DNA microarray

Ke stanovení samotné genové exprese byl využit GeneChip™ Rat Gene 2.1 ST Array Strip (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Pro degradaci rRNA byl každý vzorek procesován přes GeneChip Whole Transcript Sense Target Labeling Assay (Affymetrix, CA, USA). Komplementárně k izolované mRNA proběhla syntéza dvouvláknové cDNA, která byla označena hexamery s T7 promotorovou sekvencí a následně amplifikována T7 polymerázou produkující komplementární RNA. Ta byla využita ve 2. cyklu cDNA syntézy k produkci jednovláknové cDNA. Ze vzorku obsahující tuto jednovláknovou cDNA bylo na čip nanášeno 5,5 µg. Celý postup byl provedený podle protokolu doporučeného výrobcem a byl k němu využit systém Affymetrix GeneChip (Affymetrix, CA, USA). Výsledek hybridizace byl vyhodnocen v Affymetrix GeneChip Command Console Software a kvalita čipu zhodnocena na Affymetrix Expression Console. Data byla analyzována v softwaru Partek Genomics Suite (Partek, MO, USA) a normalizována algoritmem Robust Multichip Average (RMA).

4.4 Metabolická analýza

4.4.1 Základní metabolické parametry

Potkani byli krmeni STD (viz. 4.2) do 4. měsíce věku a následně byli rozděleni do 2 skupin ($n=6/kmen$). Kontrolní skupině byla dále podávána STD a experimentální skupině HSD po dobu 14 dnů. Samci ($n=24$) byli podrobena orálnímu glukózovému tolerančnímu testu a zvážení. Poté byli usmrceni a byla jim odebrána tkáň a krev na rozbor metabolického profilu.

4.4.1.1 Orální glukózový toleranční test (OGTT)

Potkanům byla odebrána krev z ocasní žíly a následně byl proveden OGTT. Testu předcházelo celonoční hladovění. Testování probíhalo ve 30 minutových intervalech od 0 do 180 minut po intragastrické aplikaci glukózy (30% vodný roztok, 3g/kg tělesné váhy). K determinaci glykémie ze vzorku krve z ocasní žíly byl využit glukometr Ascensia Elite Blood Glucose Meter (Bayer HealthCare, IN, USA).

4.4.1.2 Měření lipidů

Analýza koncentrace triacylglycerolů a cholesterolu ve 20 lipoproteinových frakcích byla prováděna v japonské firmě Skylight Biotech Inc. (Akita, Japonsko) pomocí modifikované vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Usui et al. 2002). Lipoproteiny jsou separovány podle velikosti partikulí a výsledný chromatogram a numerická data rozdělují lipoproteiny do 20 lipoproteinových frakcí v rámci 4 hlavních tříd (CM, VLDL, VDL a HDL).

4.4.1.3 Měření hormonů a cytokinů

Ke stanovení koncentrace hormonů a cytokinů v krvi byla použita metoda Luminex Assay. Tato metoda je založena na barevně kódovaných kuličkách, které mají navázané specifické protilátky pro požadovaný analyt. Přidáním biotinylovaných specifických protilátek dojde k tvorbě takzvaného „protilátka-antigen sendviče“. Po připojení phycoerythrinu konjugovaného se streptavidem je možná laserová detekce. Tato metoda

umožňuje kvantifikaci velkého množství různých specifických látek najednou (Ranjan et al. 2016).

Pro panel hormonů byl využit multiplexní 96 jamkový kit MILLIPLEX MAP Rat Metabolic Hormone Magnetic Bead Panel - Metabolism Multiplex Assay (MilliporeSigma, MA, USA), který umožňuje simultánní kvantifikaci amylinu, C peptidu 2, ghrelinu, gastrického inhibičního peptidu (GIP), glukagon-like peptidu 1 (GLP1), glukagonu, interleukinu 6 (IL6), inzulínu, leptinu, monocyt chemotaktického proteinu 1 (MCP1), PP, peptidu YY (PYY) a tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF α). K měření sérové hladiny adiponektinu byl použit Rat Adipocytin ELISA kit (B-Bridge International, CA, USA).

Ke koncentraci cytokinů bylo využito 96 jamkového Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine 23-Plex Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), ten je také založen na Luminex Assay, obsahuje 6,5 μ m magnetické kuličky a umožňuje detekci až 23 endocytokinů (G-CSF, GM-CSF, GROKC, IFNG, IL1A, IL1B, IL2, IL4, IL5, IL6, IL7, IL10, IL12, IL13, IL17A, IL18, M-CSF, MCP1, MIP1 α , MIP3 α , RANTES, TNF α a VEGF).

4.5 Bionformatická a statistická analýza

4.5.1 In silico analýza DNA sekvencí

DNA sekvence uvnitř diferenciálního úseku byla podrobena *in silico* analýze. Za pomoci Variant Visualiser (RGSC Genome Assembly v5.0) jsem porovnála DNA sekvence progenitorových kmenů BN.Lx/Cub (RGD ID 61117) a SHR/Olalpcv (RGD ID 631848).

Pomocí OLGA - Online List Generator & Analyzer byl vygenerován seznam genů v diferenciálním segmentu BN.Lx-SHR4.

4.5.2 Analýza transkriptomických dat

Data získaná z analýzy genové exprese byla vyhodnocena pomocí programu Partek Genomics Suite 7 (Partek, MO, USA). Pro stanovení hladiny signifikance a korekci mnohočetného porovnávání jsme použili metodu FDR (False Discovery Rate). Srovnávací analýzy zahrnovaly metody od prostého porovnání exprese jednotlivých transkriptů, po komplexnější analýzy využívající metod hierarchického shlukování, analýzy genové ontologie, profilování metabolických drah a konstrukce mechanistických sítí. Pro tyto pokročilé metody jsem použila jednotlivé moduly Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, CA, USA).

4.5.3 Analýza metabolických dat

K statistickému vyhodnocení metabolických dat byla využita metoda dvojcestné analýzy rozptylu (ANOVA) s hlavními faktory „kmen“ a „dieta“. Následně byl proveden Tukey test pro mnohonásobné porovnávání jednotlivých skupin, čímž se snižuje pravděpodobnost chyby prvního druhu. K vypočtení ANOVA a Tukey test byl využit programovací jazyk R a aplikace RStudio.

5 Výsledky

5.1 Diferenciální segment kmene BN-*Lx*.SHR4

Po potvrzení kongenního statutu kmene pomocí celogenomového screeningu sadou několika set mikrosatelitních markerů jsem za pomoci více než 30 mikrosatelitních polymorfních markerů zmapovala diferenciální segment nacházející se na 4. chromozomu dvojitě kongenního kmene BN-*Lx*.SHR4. Vymezila jsem tak úsek DNA pocházející od kmene SHR, a tedy zároveň jedinou část genomu, kterou se liší od kmene BN-*Lx*.

Zmapovaný diferenciální segment na chromozomu 4 u potkana má velikost 7,1 Mb mezi markery D4Mgh30 a D4Rat203 a odpovídá oblasti 12p13.31-32 lidského chromozomu.

Oblasti potenciální reziduální heterozygocie, kde nebylo možné nalézt polymorfní markery, jsou mezi D4Got305 a D4Mgh30 (300kb) a telomericky mezi D4Rat203 a D4Mit26.

| Marker | Pozice (bp) | | BN-Lx.SHR4 |
|----------|-------------|-----------|------------|
| D4Rat53 | 122483467 | 122483659 | BN-Lx |
| D4Rat190 | 129571413 | 129571686 | BN-Lx |
| D4Rat80 | 129904890 | 129905024 | BN-Lx |
| D4Rat57 | 132136266 | 132136446 | BN-Lx |
| D4Rat58 | 133776133 | 133776479 | BN-Lx |
| D4Mgh7 | 136351734 | 136351904 | BN-Lx |
| D4Rat194 | 142071600 | 142086300 | BN-Lx |
| D4Rat240 | 144125660 | 144125888 | BN-Lx |
| D4Rat60 | 145611768 | 145611886 | BN-Lx |
| D4Rat59 | 146086918 | 146087100 | BN-Lx |
| D4Rat141 | 146942075 | 146942261 | BN-Lx |
| D4Rat198 | 147321008 | 147321307 | BN-Lx |
| D4Rat197 | 148482590 | 148482682 | BN-Lx |
| D4Rat200 | 150038157 | 150038284 | BN-Lx |
| D4Got305 | 150379523 | 150379788 | BN-Lx |
| D4Mgh30 | 150682428 | 150682552 | SHR |
| D4Rat137 | 151102607 | 151102848 | SHR |
| D4Rat201 | 152400391 | 152400558 | SHR |
| D4Rat64 | 152498361 | 152498510 | SHR |
| D4Rat63 | 152598827 | 152598981 | SHR |
| D4Rat241 | 153126175 | 153126406 | SHR |
| D4Rat113 | 153152949 | 153153072 | SHR |
| D4Rat62 | 154054175 | 154054342 | SHR |
| D4Arb40 | 154305867 | 154306102 | SHR |
| D4Arb15 | 154307464 | 154307678 | SHR |
| Eno2 | 157288533 | 157288715 | SHR |
| D4Rat203 | 157826610 | 157826751 | SHR |
| D4Mit26 | 159995427 | 159995516 | BN-Lx |
| D4Arb27 | 164843069 | 164863271 | BN-Lx |
| D4Rat69 | 171813837 | 171813998 | BN-Lx |

Vybrané geny
v diferenciálním segmentu

Apobec1
C1r
C1rl
C1s
Ccdc77
Cd163
Cd9
Cecr2
Cops7a
Dcp1b
Grccl0
Chd4
Lpcat3
Ltbr
Mical3
Mlf2
Mrpl51
Ncapd2
Ntf3
Ptms
Ptpn6
Rad52
Scnn1a
Slc6a13
Spsb2
Tapbpl
Vwf
Wnk1

Tabulka 4: Diferenciální segment na 4. chromozomu kmene BN-Lx.SHR4 a vybrané geny nacházející se v tomto úseku

Pozice v bp je uvedena podle sestavení potkaního genomu Rnor_6.0. V pravém sloupci je naznačen rozsah diferenciálního segmentu SHR původu.


V Tabulce 4 je znázorněna velikost a umístění diferenciálního segmentu na 4. chromozomu. Celkové množství genů nacházejících se v tomto segmentu je 207.

Dle pravidel nomenklatury je označení nového kmene následující: BN.PD-(D8Rat39-D8Rat35),SHR-(D4Mgh30-D4Rat203).

5.2 *In silico* analýza DNA sekvence

Využitím dostupných webových nástrojů (viz 4.5.1) byla provedena analýza DNA sekvence v oblasti diferenciálního segmentu potkaních kmenů BN-Lx a BN-Lx.SHR4.

Celkový počet genů nalezených uvnitř diferenciálního segmentu je 207 [zdroj: OLGA, RAT Genome Assembly v6.0, <http://rgd.mcw.edu>, přístup dne 2.5.2020].

| | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Conservation | .975 | .993 | .841 | .949 | .99 | 1 | .965 | .994 | .931 | .977 | .969 | 1 |
| Genes (+) | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Clec4b2 | Clec4d | -- | -- | -- | Vamp1 |
| Genes (-) | Ankrd26 | | | B4galnt3 | Ccdc77 | Phc1 | -- | -- | -- | Vom2r51 | Vom2r52 | -- |
| Rnor 5.0 | T | T | C | A | C | T | T | T | C | T | T | G |
|  | 216,492,211 | 216,502,032 | 216,535,936 | 219,924,261 | 219,969,696 | 222,138,187 | 223,143,862 | 223,272,786 | 223,275,750 | 223,531,105 | 223,613,634 | 224,747,158 |
| BN-Lx/Cub (KNAW) | T | T | C | A | C | T | T | T | C | T | T | G |
| SHR/OlaIpcv (KNAW) | C | C | T | G | T | C | C | G | G | C | C | T |
| | D4Got305 - D4Mgh30 | | | | | | D4Mgh30 - D4Rat203 | | | | | |

Obrázek 16: Vizualizace oblasti odpovídající diferenciálnímu segmentu BN-Lx.SHR4 na 4. chromozomu (mezi markery D4Got305 a D4Rat203), znázorněny jsou vysoce konzervované (0.75 - 1.0) oblasti uvnitř exonu a nesynonymní mutace [zdroj: RGSC Genome Assembly v5.0, <http://rgd.mcw.edu>, přístup dne 4.5.2020]

Geny zleva: *Ankrd26*, *B4galnt3*, *Ccdc77*, *Phc1*, *Clec4b2*, *Clec4d*, *Vom2r51*, *Vom2r52*, *Vamp1*

U dvou z těchto genů byla na základě predikce nalezena nesynonymní mutace vedoucí ke ztrátě funkce proteinu (viz Tabulka 5).

| Název genu | Mutace | Variantní alela |
|----------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Ankrd26</i> | Potenciálně ztrátová | rs198476442 (Asn → Ser) |
| <i>Phc1</i> | Pravděpodobně ztrátová | rs197052526 (Ser → Gly) |

Tabulka 5: Geny v diferenciálním segmentu BN-*Lx*.SHR4, u nichž je predikována ztrátová mutace [zdroj: RGSC Genome Assembly v5.0, <http://rgd.mcw.edu>, přístup dne 4.5.2020]

Ankrd2 (Ankyrin Repeat Domain 26); *Phc1* (Polyhomeotic Homolog 1)

Identifikovány byly i další genetické varianty v exonech, intronech, 5'-UTR a 3'-UTR oblastech, promotorech a úsecích DNA mezi geny v rámci celého segmentu.

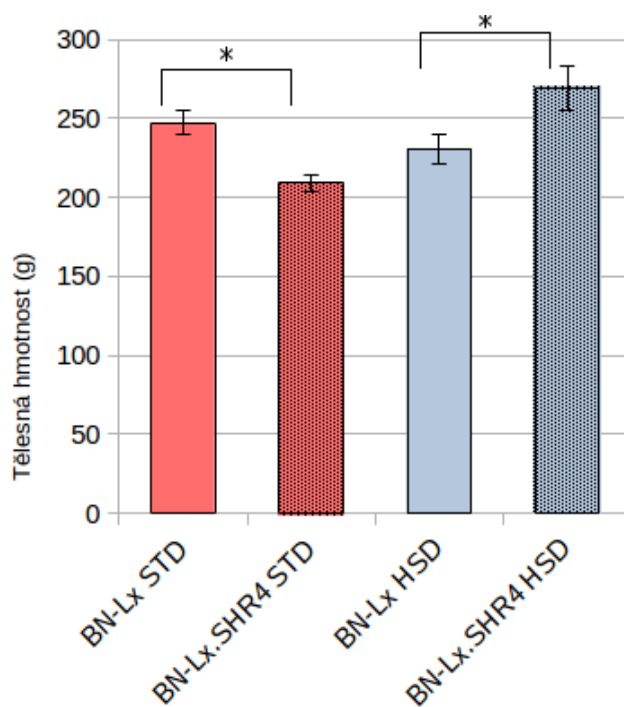
Celkově se v diferenciálním segmentu BN-*Lx*.SHR4 nachází 430 vysoce konzervovaných variant, které odlišují oba progenitorové kmeny, tedy BN-*Lx* a SHR/OlaIpcv. Z těchto variant bylo lokalizováno v exonech 55 (včetně 12 znázorněných na *Obrázku 16*), v intronech 130, v 3'-UTR 10 variant, v 5'-UTR 6 variant a mimo kódující oblasti pak zbylých 229 polymorfismů.

5.3 Metabolický profil

Ve 4. měsíci věku, po podávání stanovených diet (viz 4.2), byla u samců (n=24) kmenů BN-Lx a BN-Lx.SHR4 provedena metabolická analýza, ze které byl následně sestaven metabolický profil konkrétních potkaních kmenů pod vlivem STD a HSD.

5.3.1 Morfologické parametry

Nejprve byla stanovena tělesná hmotnost potkanů. Signifikantní rozdíly v tělesné hmotnosti byly mezi kmeny nalezeny jak při STD, tak i při HSD. Zatímco při STD kmen BN-Lx.SHR4 oproti kontrolnímu kmeni vykazoval nižší tělesnou hmotnost, při HSD se tento stav obrátil (viz Obrázek 17).



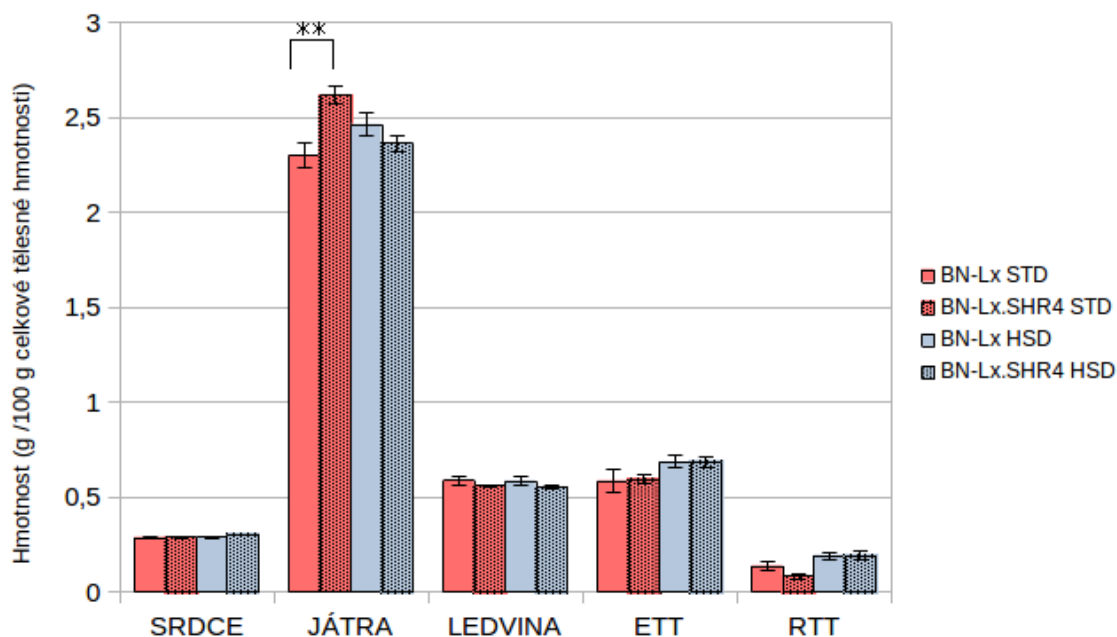
Obrázek 17: Tělesná hmotnost potkanů kmene BN-Lx a BN-Lx.SHR4 pod vlivem STD a HSD

Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. Signifikance je v rámci grafu znázorněna podle Tukeyho post-hoc testu (dvojcestná analýza rozptylu s faktory kmen:dieta) následovně:

* $\rightarrow p < 0,05$

V grafu jsou pro přehlednost vyznačena jen signifikantní párová srovnání pro faktor kmen v rámci dané diety. Signifikance dalších srovnání jsou uvedeny níže v tabulkách 6 a 7.

Následně byly odebrány a zváženy vybrané vnitřní orgány a epididymální (ETT) a retroperitoneální tuková tkáň (RTT). Jejich hmotnost byla přepočtena na 100 g celkové tělesné váhy konkrétního potkana.



ETT – Epididymální tuková tkáň; RTT – Retroperitoneální tuková tkáň

Obrázek 18: Hmotnost orgánů v přepočtu na 100 g celkové tělesné hmotnosti u kmene BN-Lx a BN-Lx.SHR4 pod vlivem STD a HSD

Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. Signifikance je v rámci grafu znázorněna podle Tukeyho post-hoc testu (dvojcestná analýza rozptylu s faktory kmen:dieta) následovně:

** $\rightarrow p < 0,01$

V grafu jsou pro přehlednost vyznačena jen signifikantní párová srovnání pro faktor kmen v rámci dané diety. Signifikance dalších srovnání jsou uvedeny níže v tabulkách 6 a 7.

Při STD byl zaznamenán výrazný rozdíl hmotností jater mezi BN-Lx a BN-Lx.SHR4 – tento kmen má signifikantně vyšší hmotnost tohoto orgánu. Pod vlivem HSD nicméně signifikance nebyla nalezena.

| | Dieta (p) | Kmen (p) | Kmen:Dieta (p) |
|------------------------|------------------------|-----------------|------------------------|
| Tělesná váha (TV) | 0,06 | 0,77 | $5,38 \cdot 10^{-4} *$ |
| Játra (g/100g TV) | 0,61 | 0,03 * | $1,47 \cdot 10^{-3} *$ |
| Srdce (g/100g TV) | 0,30 | 0,26 | 0,36 |
| Ledvina (g/100g TV) | 0,81 | 0,07 | 0,88 |
| Nadledvina (g/100g TV) | 0,10 | 0,79 | 0,54 |
| ETT (g/100g TV) | 0,02 * | 0,93 | 0,91 |
| RTT (g/100g TV) | $9,31 \cdot 10^{-4} *$ | 0,14 | 0,22 |

Tabulka 6: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření morfologických parametrů, stanovení pomocí ANOVA

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$); podrobnější data viz *Tabulka 7*

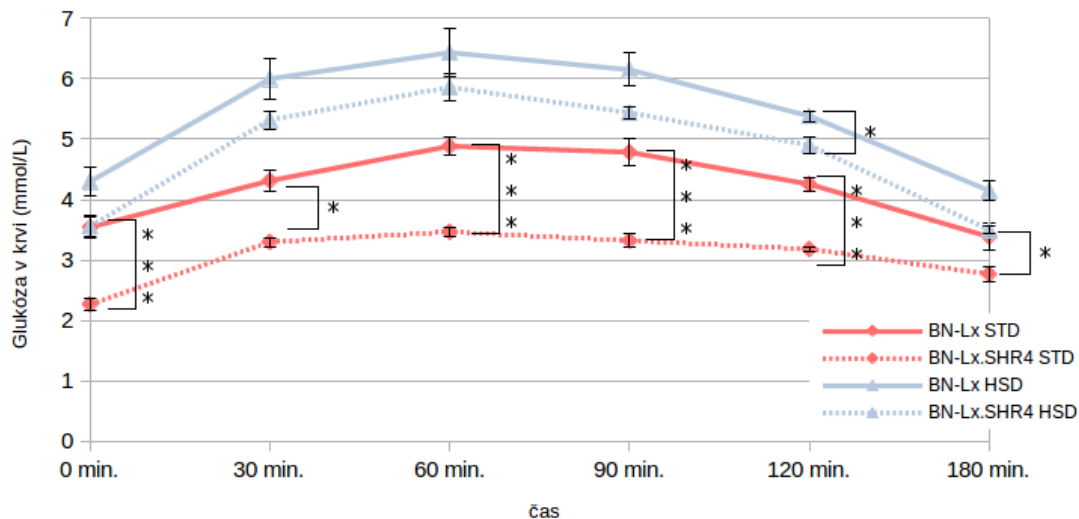
| | BN-Lx:Dieta (p) | BN-Lx.SHR4:Dieta (p) | Kmen:STD (p) | Kmen:HSD (p) |
|-------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Tělesná váha (TV) | 0,56 | $1,51 \cdot 10^{-3} *$ | 0,03 * | 0,04 * |
| Játra (g/100g TV) | 0,18 | 0,02 * | $2,65 \cdot 10^{-3} *$ | 0,63 |
| ETT (g/100g TV) | 0,29 | 0,44 | 0,99 | 0,99 |
| RTT (g/100g TV) | 0,21 | 0,01 * | 0,24 | 0,99 |

Tabulka 7: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření morfologických parametrů, stanovení pomocí Tukey's Test

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$)

5.3.2 Orální glukózový toleranční test (OGTT)

Ke zjištění glukózy v krvi byl proveden OGTT (viz 4.4.1.1), odběry byly prováděny v časových intervalech od 0 - 180 minut a naměřené hodnoty glukózy v krvi byly zaznamenány do grafu.



Obrázek 19: Orální glukózový toleranční test u kmene BN-Lx a BN-Lx.SHR4 pod vlivem STD a HSD

Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. Signifikance je v rámci grafu znázorněna podle Tukeyho post-hoc testu (dvojcestná analýza rozptylu s faktory kmen:dieta) následovně:

* $\rightarrow p < 0,05$; ** $\rightarrow p < 0,01$; *** $\rightarrow p < 0,01$

V grafu jsou pro přehlednost vyznačena jen signifikantní párová srovnání pro faktor kmen v rámci dané diety. Signifikance dalších srovnání jsou uvedeny níže v tabulkách 8 a 9.

| | Dieta (p) | Kmen (p) | Kmen:Dieta (p) |
|---------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 0 min. | $1,95 \cdot 10^{-5} *$ | $1,26 \cdot 10^{-5} *$ | 0,15 |
| 30 min. | $3,48 \cdot 10^{-8} *$ | $5,47 \cdot 10^{-4} *$ | 0,44 |
| 60 min. | $1,14 \cdot 10^{-7} *$ | $3,25 \cdot 10^{-4} *$ | 0,09 |
| 90 min. | $3,16 \cdot 10^{-8} *$ | $1,26 \cdot 10^{-5} *$ | 0,07 |
| 120 min. | $6,65 \cdot 10^{-12} *$ | $7,02 \cdot 10^{-8} *$ | $7,24 \cdot 10^{-3} *$ |
| 180 min. | $1,70 \cdot 10^{-4} *$ | $8,43 \cdot 10^{-4} *$ | 0,92 |
| AUC 180 min.* | $5,02 \cdot 10^{-10} *$ | $1,18 \cdot 10^{-6} *$ | 0,06 |

* plocha pod glykemickou křivkou

Tabulka 8: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků OGTT, stanovení pomocí ANOVA

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$); podrobnější data viz Tabulka 9

| | BN-Lx:Dieta (p) | BN-Lx.SHR4:Dieta (p) | Kmen:STD (p) | Kmen:HSD (p) |
|-----------------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 min. | 0,02 * | $5,23 \cdot 10^{-4}$ * | $2,32 \cdot 10^{-4}$ * | 0,06 |
| 30 min. | $5,77 \cdot 10^{-5}$ * | $1,62 \cdot 10^{-5}$ * | 0,01 * | 0,16 |
| 60 min. | $7,00 \cdot 10^{-4}$ * | $8,90 \cdot 10^{-6}$ * | $1,71 \cdot 10^{-3}$ * | 0,39 |
| 90 min. | $2,90 \cdot 10^{-4}$ * | $2,70 \cdot 10^{-6}$ * | $1,25 \cdot 10^{-4}$ * | 0,10 |
| 120 min. | $3,00 \cdot 10^{-8}$ * | $1,00 \cdot 10^{-10}$ * | $6,00 \cdot 10^{-7}$ * | 0,01 * |
| 180 min. | 0,01 * | 0,02 * | 0,04 * | 0,06 |
| AUC (180 min.)* | $5,90 \cdot 10^{-7}$ * | $1,00 \cdot 10^{-8}$ * | $2,17 \cdot 10^{-5}$ * | 0,02 * |

*plocha pod glykemickou křivkou

Tabulka 9: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků OGTT, stanovení pomocí Tukey's Test

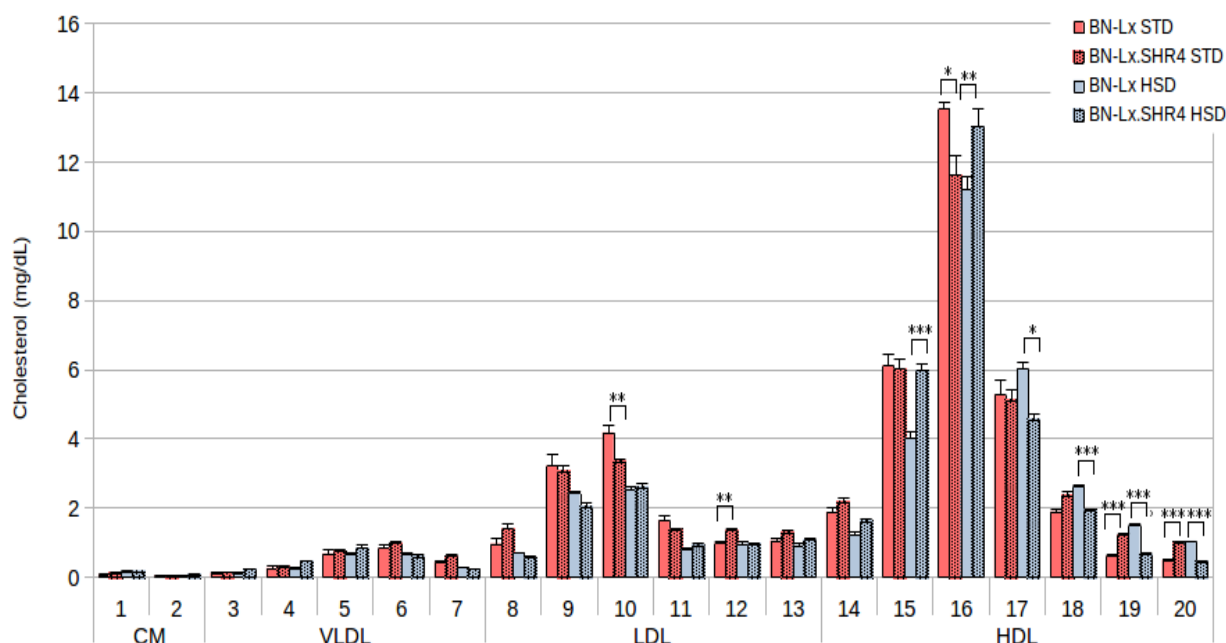
* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$)

Z výsledků OGTT je patrné, že HSD má vliv na koncentraci glukózy v krvi. Zároveň je pozorovatelný rozdíl mezi kmeny – BN-Lx.SHR4 má prokazatelně nižší glykémii při STD a to po celou dobu měření. Pod vlivem HSD byla u tohoto kmene zaznamenána signifikantně nižší hladina jen ve 120. minutě měření.

Plocha pod glykemickou křivkou byla vyšší u BN-Lx, a to jak za podmínek STD (BN-Lx: 765,85 +/- 28,54; BN-Lx.SHR 4: 562,90 +/- 9,03 mmol/l/180min, $p = 2,17 \cdot 10^{-5}$), tak i HSD (BN-Lx: 988,75 +/- 32,88; BN-Lx.SHR 4: 877,50 +/- 11,51 mmol/l/180min, $p = 0,02$).

5.3.3 Lipidy

Distribuce lipidů v krvi je důležitým faktorem pro rozvoj a diagnózu MetS. Hladina a distribuce partikulí cholesterolu a triacylglycerolů byla měřena ve 20 lipoproteinových frakcích, které byly rozděleny a seřazeny podle velikosti.



Obrázek 20: Koncentrace cholesterolu ve 20 lipoproteinových frakcích u kmenů BN-Lx a BN-Lx.SHR4 při STD a HSD

Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. Signifikance je v rámci grafu znázorněna podle Tukeyho post-hoc testu (dvojcestná analýza rozptylu s faktorem kmen:dieta) následovně:

* $\rightarrow p < 0,05$; ** $\rightarrow p < 0,01$; *** $\rightarrow p < 0,001$

V grafu jsou pro přehlednost vyznačena jen signifikantní párová srovnání pro faktor kmen v rámci dané diety. Signifikance dalších srovnání jsou uvedeny níže v tabulkách 10 a 11.

Signifikantní změny koncentrací lipoproteinových frakcí cholesterolu u kmenů pod vlivem standardní a vysokosacharóзовé diety byly nalezeny především u HDL partikulí (frakce 15-20).

| | Dieta (p) | Kmen (p) | Kmen:Dieta (p) |
|---------------------|---------------------------|-----------------|-----------------------|
| Celkové CM-C | 4,09 . 10 ⁻³ * | 0,21 | 0,29 |
| Celkový VLDL-C | 0,21 | 0,16 | 0,84 |
| Celkový LDL-C | 3,68 . 10 ⁻⁷ * | 0,71 | 0,98 |
| Celkový HDL-C | 0,06 | 0,89 | 0,66 |
| Celkový cholesterol | 5,11 . 10 ⁻⁴ * | 0,79 | 0,81 |

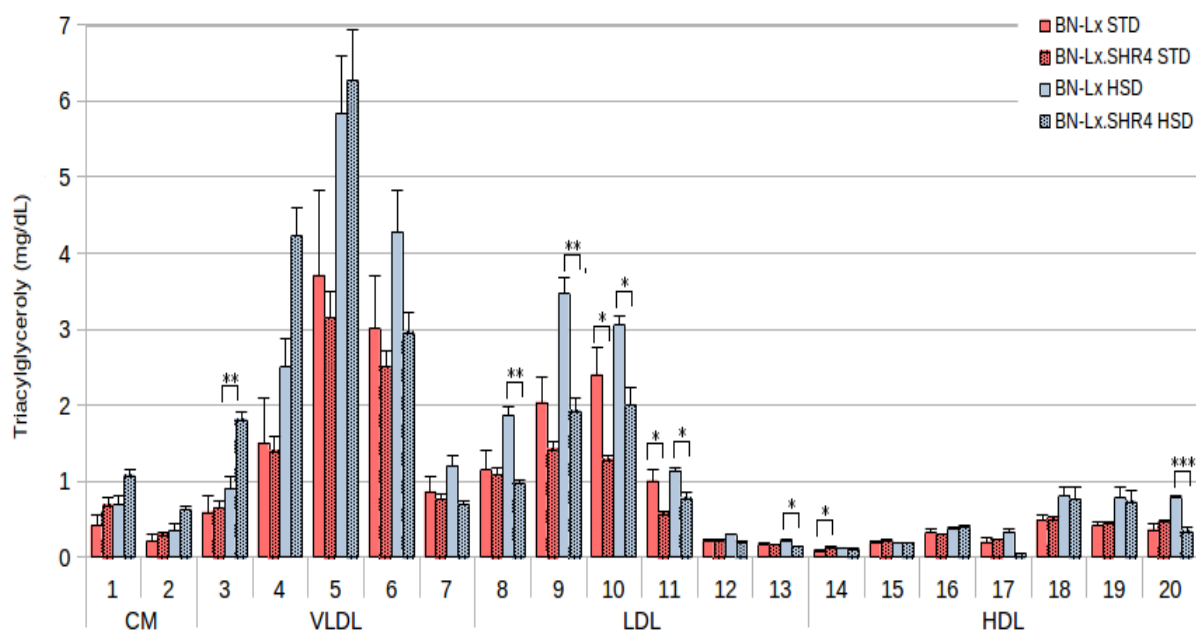
Tabulka 10: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření hladiny cholesterolu, stanovení pomocí ANOVA

* statisticky významná hodnota (p< 0,05); podrobnější data viz *Tabulka 11*

| | BN-Lx:Dieta (p) | BN-Lx.SHR4:Dieta (p) | Kmen:STD (p) | Kmen:HSD (p) |
|---------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Celkové CM-C | 0,02 * | 0,51 | 0,35 | 0,99 |
| Celkový LDL-C | 1,28 . 10 ⁻⁴ * | 3,66 . 10 ⁻⁴ * | 0,98 | 0,99 |
| Celkový cholesterol | 0,02 * | 0,07 | 0,99 | 0,98 |

Tabulka 11: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření hladiny cholesterolu, stanovení pomocí Tukey's Test

* statisticky významná hodnota (p< 0,05)



Obrázek 21: Koncentrace triacylglycerolů ve 20 lipoproteinových frakcích kmenů BN-Lx a BN-Lx.SHR4 při STD a HSD

Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměr ± SEM. Signifikance je v rámci grafu znázorněna podle Tukeyho post-hoc testu (dvojcestná analýza rozptylu s faktorem kmen:dieta) následovně:

* → $p < 0,05$; ** → $p < 0,01$; *** → $p < 0,001$

V grafu jsou pro přehlednost vyznačena jen významná párová srovnání pro faktor kmen v rámci dané diety. Signifikance dalších srovnání jsou uvedeny níže v tabulkách 12 a 13.

U frakce lipoproteinů triacylglycerolů byla mezi kmeny pod vlivem diet významně rozdílná koncentrace především u LDL-TG (frakce 8-13). Také je patrné, že koncentrace LDL-TG je u BN-Lx.SHR4 snížena oproti kontrolnímu kmeni.

| | Dieta (p) | Kmen (p) | Kmen:STD (p) | Kmen:HSD (p) |
|-----------------|------------------------|------------------------|--------------|------------------------|
| Celkové CM-TG | 0,01 * | 0,02 * | 0,60 | 0,15 * |
| Celkový VLDL-TG | $4,61 \cdot 10^{-6}$ * | 0,93 | 0,96 | 0,97 |
| Celkový LDL-TG | $3,02 \cdot 10^{-3}$ * | $1,77 \cdot 10^{-4}$ * | 0,09 | $2,99 \cdot 10^{-3}$ * |
| Celkový HDL-TG | 0,01 * | 0,39 | 0,95 | 0,29 |
| Celkový TG | $1,31 \cdot 10^{-3}$ * | 0,26 | 0,84 | 0,86 |

Tabulka 12: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření hladiny triacylglycerolu, stanovení pomocí ANOVA;

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$); podrobnější data viz Tabulka 13

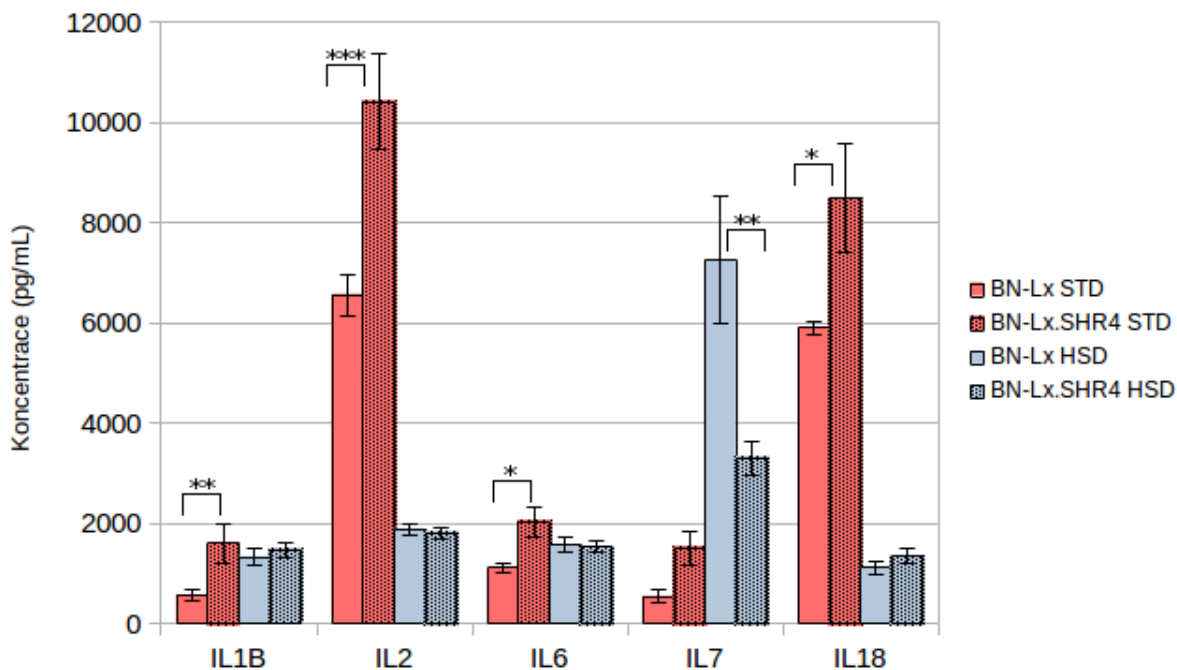
| | BN-Lx:Dieta | BN-Lx.SHR4:Dieta | Kmen:STD | Kmen:HSD |
|-----------------|--------------------|-------------------------|-----------------|---------------------------|
| | (p) | (p) | (p) | (p) |
| Celkové CM-TG | 0,43 | 0,09 | 0,60 | 0,15 |
| Celkový VLDL-TG | 0,24 | 0,07 | 0,96 | 0,97 |
| Celkový LDL-TG | 0,01 * | 0,57 | 0,09 | 2,99 . 10 ⁻³ * |
| Celkový HDL-TG | 0,02 * | 0,91 | 0,95 | 0,29 |
| Celkový TG | 0,84 | 0,08 | 0,84 | 0,86 |

Tabulka 13: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření hladiny triacylglycerolů, stanovení pomocí Tukey's Test

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$)

5.3.4 Cytokiny

Složky imunitního systému se značně podílí na mnoha metabolických procesech. Za pomoci metody Luminex Assay byla naměřena hladina cytokinů.



Obrázek 22: Koncentrace IL2, IL6, IL7 a IL18 v krvi BN-Lx a BN-Lx.SHR4 při STD a HSD

Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. Signifikance je v rámci grafu znázorněna podle Tukeyho post-hoc testu (dvojcestná analýza rozptylu s faktory kmen:dieta) následovně:

* $\rightarrow p < 0,05$; ** $\rightarrow p < 0,01$; *** $\rightarrow p < 0,001$

V grafu jsou pro přehlednost vyznačena jen signifikantní párová srovnání pro faktor kmen v rámci dané diety. Signifikance dalších srovnání jsou uvedeny níže v tabulkách 14 a 15.

| | Kmen (p) | Dieta (p) | Kmen:Dieta (p) |
|------|-------------------------|-----------|------------------------|
| IL1A | $2,07 \cdot 10^{-4} *$ | 0,37 | 0,56 |
| IL1B | 0,13 | 0,01 * | 0,05 |
| IL2 | $5,87 \cdot 10^{-11} *$ | 0,01 * | $9,35 \cdot 10^{-4} *$ |
| IL4 | $2,57 \cdot 10^{-9} *$ | 0,12 | 0,46 |
| IL5 | $6,12 \cdot 10^{-6} *$ | 0,37 | 0,55 |
| IL6 | 0,92 | 0,03 * | 0,02 * |
| IL7 | $7,19 \cdot 10^{-6} *$ | 0,06 | $2,84 \cdot 10^{-3} *$ |

| | | | |
|------|-------------------------|--------|--------|
| IL10 | $7,38 \cdot 10^{-9} *$ | 0,10 | 0,61 |
| IL12 | 0,03 * | 0,04 * | 0,43 |
| IL13 | $2,1 \cdot 10^{-3} *$ | 0,03 * | 0,29 |
| IL17 | $9,83 \cdot 10^{-9} *$ | 0,53 | 0,80 |
| IL18 | $9,95 \cdot 10^{-10} *$ | 0,02 * | 0,04 * |

Tabulka 14: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření interleukinů, měření pomocí ANOVA

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$); podrobnější data viz Tabulka 15

| | BN-Lx:Dieta (p) | BN-Lx.SHR4:Dieta (p) | Kmen:STD (p) | Kmen:HSD (p) |
|------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| IL1A | $8,70 \cdot 10^{-3} *$ | 0,05 | 0,71 | 0,99 |
| IL1B | 0,08 | 0,97 | 0,01 * | 0,96 |
| IL2 | $1,00 \cdot 10^{-6} *$ | $1,00 \cdot 10^{-9} *$ | $2,17 \cdot 10^{-4} *$ | 0,99 |
| IL4 | $1,20 \cdot 10^{-6} *$ | $1,03 \cdot 10^{-5} *$ | 0,37 | 0,93 |
| IL5 | $6,95 \cdot 10^{-4} *$ | $4,84 \cdot 10^{-3} *$ | 0,70 | 0,99 |
| IL6 | 0,36 | 0,30 | 0,01 * | 0,99 |
| IL7 | $9,90 \cdot 10^{-6} *$ | 0,33 | 0,78 | $4,01 \cdot 10^{-4} *$ |
| IL10 | $1,85 \cdot 10^{-5} *$ | $4,10 \cdot 10^{-6} *$ | 0,82 | 0,41 |
| IL12 | 0,66 | 0,13 | 0,19 | 0,77 |
| IL13 | 0,01 * | 0,33 | 0,12 | 0,84 |
| IL17 | $1,60 \cdot 10^{-5} *$ | $7,60 \cdot 10^{-6} *$ | 0,99 | 0,92 |
| IL18 | $3,37 \cdot 10^{-5} *$ | $1,00 \cdot 10^{-7} *$ | 0,02 * | 0,99 |

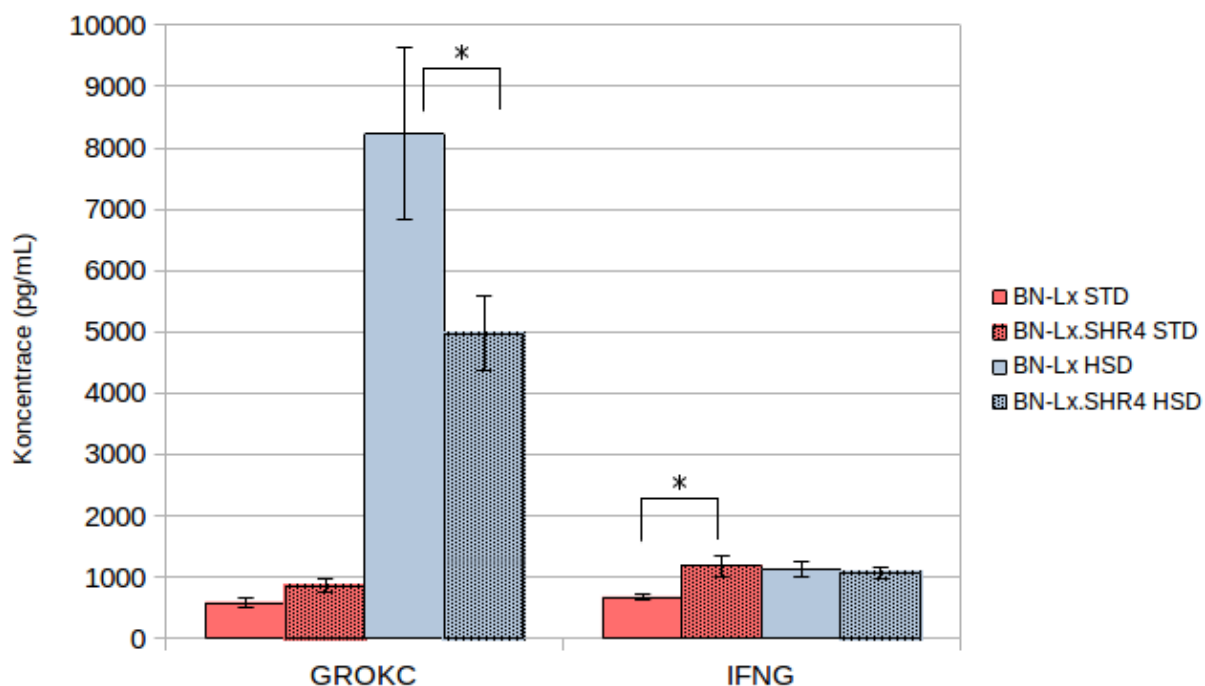
Tabulka 15: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření interleukinů, měření pomocí Tukey's Test

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$)

Naměřeny byly hodnoty koncentrací několika interleukinů (IL1 - IL18) v krvi potkanů BN-Lx a BN-Lx.SHR4. Signifikantní rozdíly v koncentracích mezi kmeny v souvislosti s dietou byly nalezeny hned u několika z nich - IL2, IL6, IL7 a IL18 (viz Obrázek 22).

Rozdíly v koncentracích mezi kmeny se jevíly při STD, kdy u třech z výše zmíněných interleukinů (IL2, IL6 a IL18) byla zaznamenána jejich vyšší hladina u kmene BN-Lx.SHR4. Na druhou stranu, při HSD se hladina těchto interleukinů v krvi pohybovala v podobných

hodnotách. Výjimkou je IL7, jehož koncentrace byla signifikantně nižší u kmene BN-Lx.SHR4 pod vlivem HSD.



Obrázek 23: Koncentrace GROKc a IFNG v krvi BN-Lx a BN-Lx.SHR4 při STD a HSD

Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. Signifikance je v rámci grafu znázorněna podle Tukeyho post-hoc testu (dvojcestná analýza rozptylu s faktory kmen:dieta) následovně:

* $\rightarrow p < 0,05$

V grafu jsou pro přehlednost vyznačena jen signifikantní párová srovnání pro faktor kmen v rámci dané diety. Signifikance dalších srovnání jsou uvedeny níže v tabulkách 16 a 17.

Hladina GROKc v krvi se mezi kmény významně lišila pod vlivem HSD, konkrétně u BN-Lx-SHR4 byla koncentrace tohoto cytokinu nižší.

IFNG v krvi potkanů byl signifikantně vyšší při STD u BN-Lx.SHR4.

| | Dieta (p) | Kmen (p) | Kmen:Dieta (p) |
|-------|---------------------------|-----------------|-----------------------|
| GROKC | 5,02 . 10 ⁻⁷ * | 0,12 | 0,04 * |
| IFNG | 0,16 | 0,07 | 0,03 * |

Tabulka 16: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření GROKC a IFNG, stanovení pomocí ANOVA

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$); podrobnější data viz *Tabulka 17*

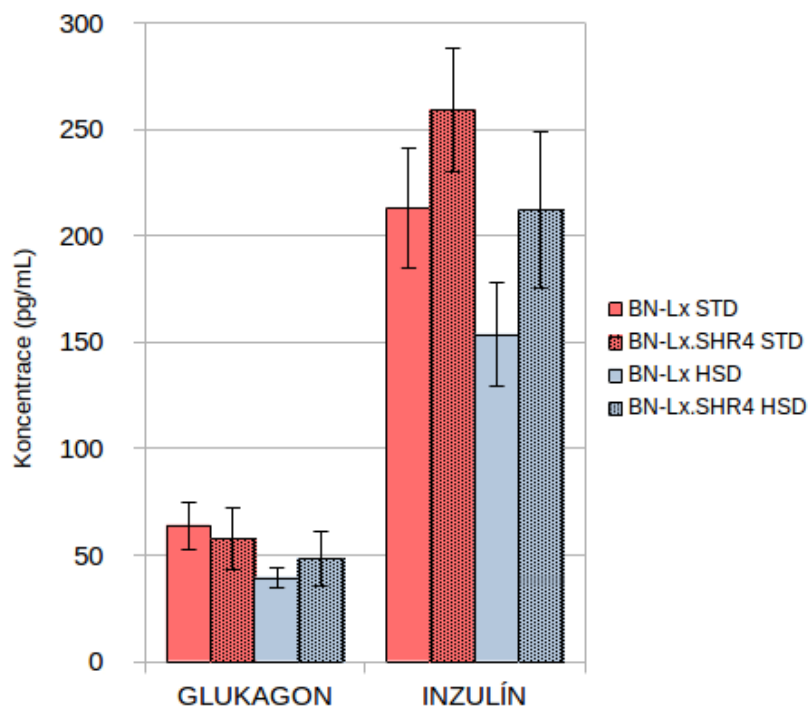
| | BN-Lx:Dieta (p) | BN-Lx.SHR4:Dieta (p) | Kmen:STD (p) | Kmen:HSD (p) |
|-------|---------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|
| GROKC | 8,10 . 10 ⁻⁶ * | 0,01 * | 0,99 | 0,03 * |
| IFNG | 1,00 . 10 ⁻⁹ * | 1,00 . 10 ⁻⁷ * | 0,03 * | 0,99 |

Tabulka 17: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření GROKC a IFNG, stanovení pomocí Tukey's Test

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$)

5.3.5 Hormony

Pomocí Luminex Assay byly také zjištěny data pro porovnání hormonálního profilu potkaních kmenů BN-Lx a BN-Lx.SHR4 s faktorem diety. Hormonální dysbalance patří mezi kontributy MetS a stanovení koncentrace hormonů je tedy klíčové pro determinaci rozvoje tohoto onemocnění.



Obrázek 24: Koncentrace glukagonu a inzulínu v krvi u BN-Lx a BN-Lx.SHR4 při STD a HSD

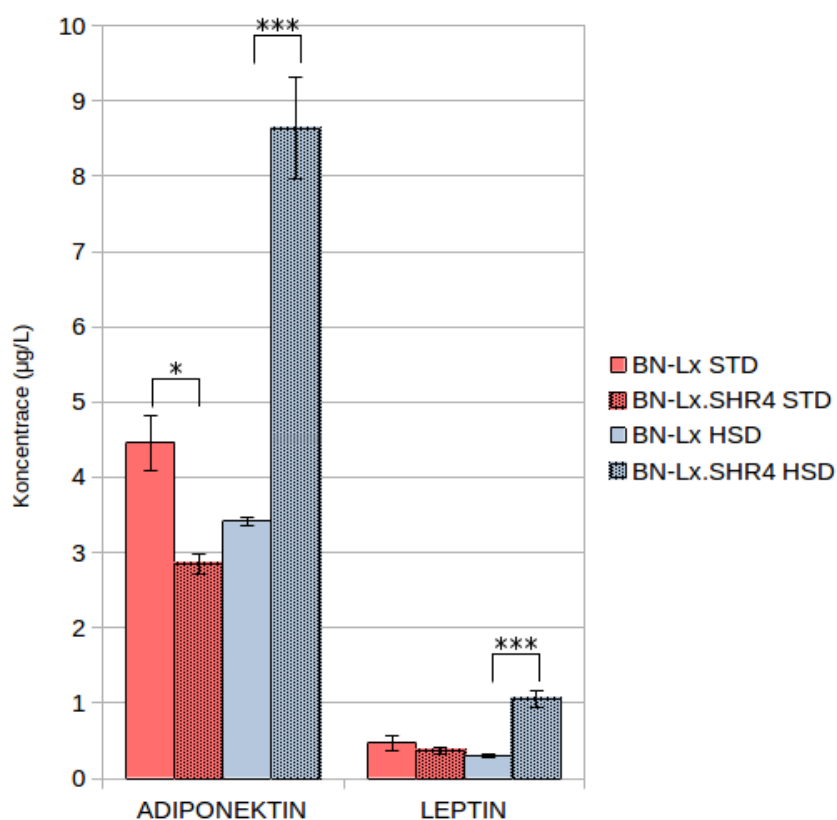
Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměr \pm SEM.

| | Dieta (p) | Kmen (p) | Kmen:Dieta (p) |
|----------|-----------|----------|----------------|
| Glukagon | 0,17 | 0,86 | 0,52 |
| Inzulín | 0,09 | 0,09 | 0,83 |

Tabulka 18: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření inzulínu a glukagonu, stanovení pomocí ANOVA

Z výsledků měření nicméně vyplývá, že ani jeden z těchto hormonů nebyl u našich modelových kmenů významně rozdílný v koncentraci v krvi.

Dalšími významnými hormony působícími při rozvoji MetS jsou adiponektin a leptin. Oba tyto hormony jsou produkovány v adipocytech, ovlivňují pocity hladu a sytosti a také hrají roli při inzulínové senzitivizaci či rezistenci (viz 2.1.2.2).



Obrázek 25: Koncentrace adiponektinu a leptinu v krvi u BN-Lx a BN-Lx.SHR4

Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměr ± SEM. Signifikance je v rámci grafu znázorněna podle Tukeyho post-hoc testu (dvojcestná analýza rozptylu s faktory kmen:dieta) následovně:

* → $p < 0,05$; *** → $p < 0,001$

V grafu jsou pro přehlednost vyznačena jen signifikantní párová srovnání pro faktor kmen v rámci dané diety. Signifikance dalších srovnání jsou uvedeny níže v tabulkách 19 a 20.

| | Dieta (p) | Kmen (p) | Kmen:Dieta (p) |
|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Adiponektin | $1,79 \cdot 10^{-5} *$ | $6,45 \cdot 10^{-4} *$ | $1,44 \cdot 10^{-8} *$ |
| Leptin | $9,93 \cdot 10^{-3} *$ | $1,50 \cdot 10^{-3} *$ | $2,36 \cdot 10^{-5} *$ |

Tabulka 19: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření adiponektinu a leptinu, stanovení pomocí ANOVA

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$); podrobnější data viz Tabulka 20

| | BN-Lx:Dieta (p) | BN-Lx.SHR4:Dieta (p) | Kmen:STD (p) | Kmen:HSD (p) |
|-------------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Adiponektin | 0,20 | $1,00 \cdot 10^{-9} *$ | 0,02 * | $1,00 \cdot 10^{-8} *$ |
| Leptin | 0,39 | $4,43 \cdot 10^{-5} *$ | 0,76 | $1,29 \cdot 10^{-5} *$ |

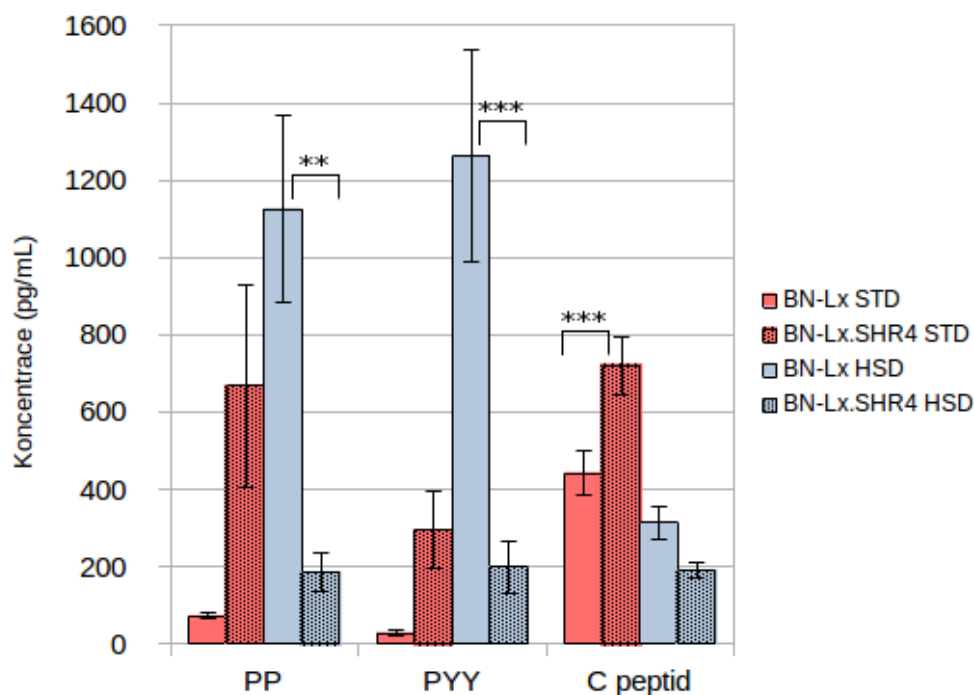
Tabulka 20: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření adiponektinu a leptinu, stanovení pomocí ANOVA

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$)

Koncentrace adiponektinu byla signifikantně snižena u BN-Lx.SHR4 (oproti BN-Lx) při STD, naopak u HSD tento kmen vykazuje výrazně vyšší hladinu adiponektinu než kmen kontrolní.

Hladina leptinu v krvi vykazuje signifikantní rozdíly pod vlivem HSD, kdy má BN-Lx.SHR4 vyšší koncentraci tohoto hormonu v krvi.

Z výsledků je také vysledovatelné, že BN-Lx nevykazuje signifikantně změněné hladiny leptinu a adiponektinu v závislosti na typu diety. Naopak BN-Lx.SHR4 má signifikantně zvýšenou expresi obou hormonů při HSD, a to jak v porovnání vůči kontrolnímu kmeni, tak i v rámci kmene a rozdílných diet. Zdá se tedy, že vliv diety na produkci těchto hormonů je daleko vyšší než u kontrolního kmene.



Obrázek 26: Koncentrace PP, PYY a C peptidu v krvi u BN-Lx a BN-Lx.SHR4 pod vlivem STD a HSD

Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměr ± SEM. Signifikance je v rámci grafu znázorněna podle Tukeyho post-hoc testu (dvojcestná analýza rozptylu s faktorem kmen:dieta) následovně:

** → $p < 0,01$; *** → $p < 0,001$

V grafu jsou pro přehlednost vyznačena jen signifikantní párová srovnání pro faktor kmen v rámci dané diety. Signifikance dalších srovnání jsou uvedeny níže v tabulkách 21 a 22.

Hladina PP v krvi byla u BN-Lx.SHR4 (oproti BN-Lx) signifikantně snížena při HSD, tento stejný efekt byl pozorován i u PYY. Naopak koncentrace C peptidu pod vlivem STD byla u BN-Lx.SHR4 významně zvýšená.

| | Dieta (p) | Kmen (p) | Kmen:Dieta (p) |
|----------|------------------------|----------|------------------------|
| PP | 0,13 | 0,35 | $4,05 \cdot 10^{-4} *$ |
| PYY | $1,09 \cdot 10^{-3} *$ | $0,01 *$ | $2,45 \cdot 10^{-4} *$ |
| C peptid | $7,51 \cdot 10^{-6} *$ | 0,32 | $1,19 \cdot 10^{-3} *$ |

Tabulka 21: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření PP, PYY a C peptidu, stanovení pomocí ANOVA

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$); podrobnější data viz Tabulka 22

| | BN-Lx:Dieta (p) | BN-Lx.SHR4:Dieta (p) | Kmen:STD (p) | Kmen:HSD (p) |
|----------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| PP | $2,82 \cdot 10^{-3} *$ | 0,26 | 0,12 | $7,59 \cdot 10^{-3} *$ |
| PYY | $5,66 \cdot 10^{-5} *$ | 0,96 | 0,59 | $3,44 \cdot 10^{-4} *$ |
| C peptid | 0,31 | $7,00 \cdot 10^{-6} *$ | $8,50 \cdot 10^{-3} *$ | 0,35 |

Tabulka 22: P-hodnota pro stanovení významnosti výsledků měření PP, PYY a C peptidu, stanovení pomocí Tukey's Test

* statisticky významná hodnota ($p < 0,05$)

5.4 Transkriptomický profil

Po genotypizaci byla provedena analýza genové exprese BN-*Lx*.SHR4 v porovnání s kontrolním kmenem BN-*Lx* a pod vlivem dvou různých diet – HSD a STD. K analýze transkriptomického profilu byla využita metoda microarray.

V rámci globálního transkriptomického profilování byla provedena čtyři párová porovnání jaterní exprese, a to mezi oběma kmeny za podmínek standardní a vysokosacharóзовé diety, porovnání efektu podání vysokosacharóзовé diety kmeni BN-*Lx* a BN-*Lx*.SHR4 po korekci na mnohočetná porovnání (FDR < 0,05).

Očekávaně mohutný vliv na genovou expresi v játrech obou kmenů měla vysokosacharóзовá dieta. U kmene BN-*Lx* se o více než 20% signifikantně změnila exprese 2355 transkriptů, u BN-*Lx*.SHR4 u 1887. Z toho ovšem pouze 686 transkriptů bylo současně diferenciatně exprimováno u obou kmenů, ostatní efekty byly kmenově specifické.

U potkanů krmených standardní dietou jsme mezi kmeny zjistili 511 diferenciatně exprimovaných transkriptů, po expozici vysokosacharóзовé dietě jen 343 (z toho se 39 transkriptů vyskytovalo v obou skupinách). Při srovnání výsledků s výčtem genů obsažených v diferenciatním segmentu dvojité kongenního kmene se ukázalo, že rozdílnou expresi mezi BN-*Lx* a BN-*Lx*.SHR4 za podmínek obou diet mají geny *Apobec1*, *Ccdc77*, *Milf2*, *Ptpn6*, *Scnn1a*; jen na standardní dietě pak *Cd163*, *Ncapd2*, *Ptms*, *Vwf*; jen na vysokosacharóзовé dietě *Cecr2*, *Grcc10*, *Hdhd5*, *Loc103692218*, *Mical3*, *Slc6a13*.

5.4.1 Hlavní faktor: Kmen

| Gen | Název genu | Fold change BN-Lx.SHR4 vs BN-Lx | |
|-----------------|--|---------------------------------|-------|
| | | STD | HSD |
| <i>Apobec1</i> | apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 1 | 1,59 | 1,80 |
| <i>Ccdc77</i> ● | coiled-coil domain containing 77 | 2,24 | 1,91 |
| <i>Cd163</i> | cluster of differentiation 163 | -1,75 | -- |
| <i>Cecr2</i> | histone acetyl-lysine reader | -- | 1,58 |
| <i>Grcc10</i> | gene rich cluster, C10 gene | -- | -1,35 |
| <i>Mical3</i> | microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 3 | -- | 1,20 |
| <i>Mlf2</i> | myeloid leukemia factor 2 | 1,34 | 1,53 |
| <i>Ncapd2</i> | non-SMC condensin I complex, subunit D2 | 1,46 | -- |
| <i>Ptms</i> | parathymosin | 1,31 | -- |
| <i>Ptpn6</i> | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6 | 1,40 | 1,29 |
| <i>Scnn1a</i> | sodium channel epithelial 1 subunit alpha | 2,08 | 1,88 |
| <i>Slc6a13</i> | solute carrier family 6 member 13 | -- | 1,39 |
| <i>Vwf</i> ● | von Willebrand factor | -1,36 | -- |

● nesynonymní záměna

Tabulka 23: Geny v diferenciálním segmentu na 4. chromozomu, porovnání kmene BN-Lx.SHR4 proti kontrolnímu kmeni BN-Lx pod vlivem diety

V tabulce jsou zahrnuty geny, u kterých byla prokázána signifikantní (fold change > 1,2) změna genové exprese u potkaního kmene BN-Lx.SHR4 v porovnání s BN-Lx. Všechny výše uvedené geny se nachází v oblasti diferenciálního úseku na chromozomu 4. Změna exprese je stanovena pomocí „fold change“, tato hodnota je definována jako poměr dvou veličin a udává míru velikosti účinku.

Z výsledků vyplývá, že množství genů bylo signifikantně nadexprimováno u BN-Lx.SHR4 oproti kontrolnímu kmeni. Některé z těchto genů byly už dříve asociovány s metabolickými poruchami (viz 6.1.1).

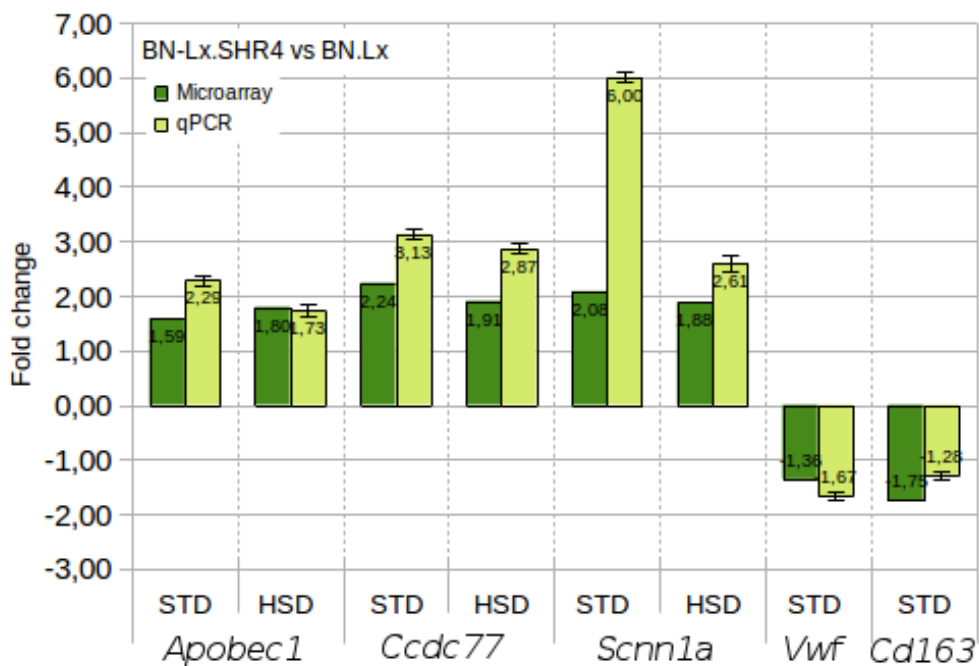
5.4.2 Hlavní faktor: Dieta

| Gen | Název genu | Fold change HSD vs STD | |
|----------------|--|------------------------|-------|
| | | BN-Lx.SHR4 | BN-Lx |
| <i>C1r</i> | complement C1r | 1,55 | 1,66 |
| <i>C1rl</i> | complement C1r subcomponent like | 1,59 | 1,89 |
| <i>C1s</i> | complement C1s | 1,78 | 1,94 |
| <i>Cd9</i> | CD9 molecule | -- | -1,31 |
| <i>Cecr2</i> | histone acetyl-lysine reader | -1,43 | -1,96 |
| <i>Chd4</i> | chromodomain helicase DNA binding protein 4 | -1,20 | -1,21 |
| <i>Cops7a</i> | COP9 signalosome subunit 7A | -- | -1,24 |
| <i>Dcp1b</i> | decapping mRNA 1B | -1,24 | -- |
| <i>Lpcat3</i> | lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 | -1,30 | -1,27 |
| <i>Ltbr</i> | lymphotoxin beta receptor | -- | 1,22 |
| <i>Mical3</i> | microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 3 | -- | -1,25 |
| <i>Mlf2</i> | myeloid leukemia factor 2 | -- | -1,23 |
| <i>Mrpl51</i> | mitochondrial ribosomal protein L51 | -- | 1,23 |
| <i>Ncapd2</i> | non-SMC condensin I complex, subunit D2 | -1,38 | -- |
| <i>Ntf3</i> | neurotrophin 3 | -- | 1,87 |
| <i>Ptms</i> | parathyrosin | -1,47 | -- |
| <i>Rad52</i> | RAD52 homolog, DNA repair protein | -1,33 | -- |
| <i>Slc6a13</i> | solute carrier family 6 member 13 | -1,31 | -1,59 |
| <i>Spsb2</i> | splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 2 | 1,21 | -- |
| <i>Tapbp1</i> | TAP binding protein-like | -- | 1,35 |
| <i>Wnk1</i> | WNK lysine deficient protein kinase 1 | -- | -1,25 |

Tabulka 24: Geny v diferenciálním segmentu na 4. chromozomu, porovnání HSD oproti STD v závislosti na kmeni potkana

V tabulce jsou uvedeny geny, jejichž exprese byla signifikantně změněna (fold change > 1,2), hlavním faktorem je u těchto dat dieta – porovnání změny exprese u HSD oproti STD. Všechny tyto geny se také nacházejí v oblasti diferenciálního segmentu na 4. chromozomu.

5.4.3 Ověření genové exprese

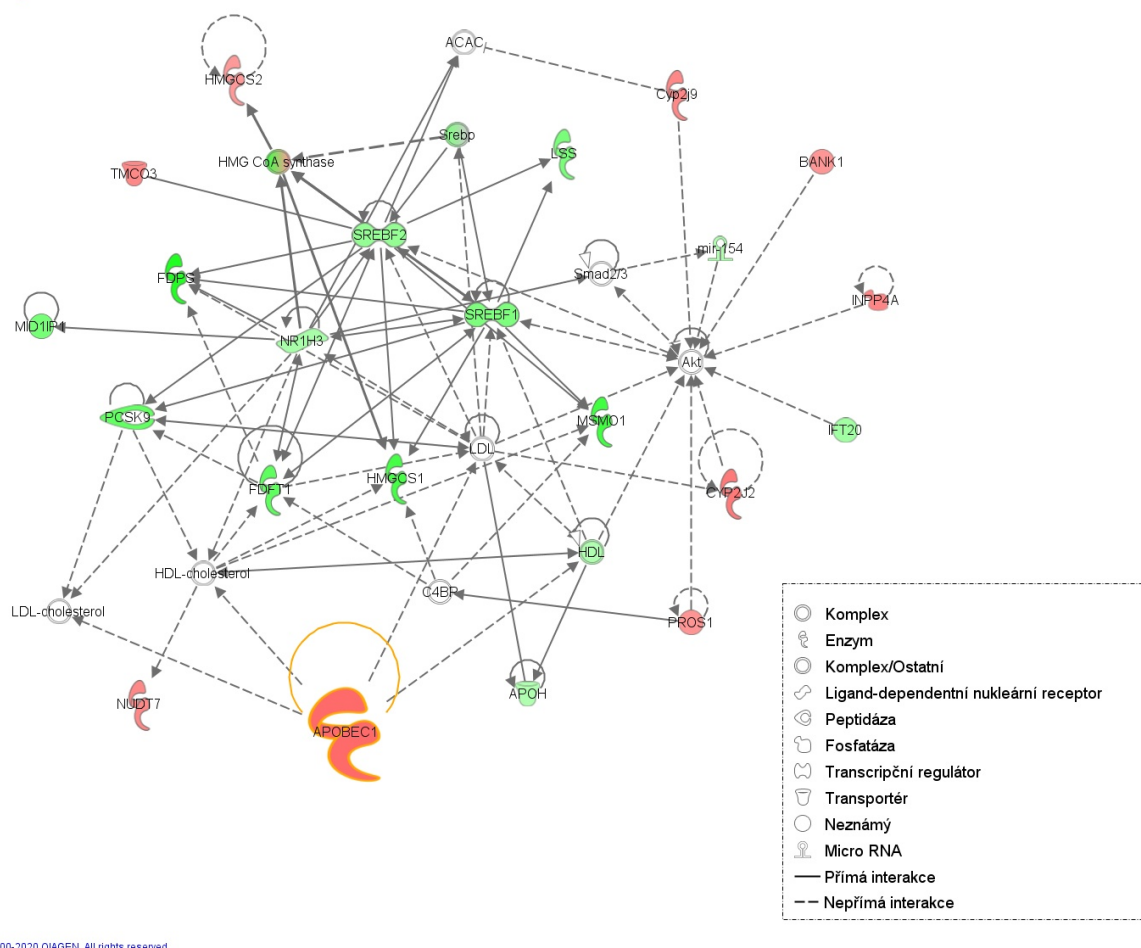


Obrázek 27: Porovnání výsledků z microarray a jejich ověření pomocí qPCR

U vybraných genů (*Apobec1* - Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 1, *Ccdc77* - Coiled-coil Domain Containing 77, *Scnn1a* - Sodium Channel Epithelial 1 Subunit Alpha, *Vwf* – Von Willebrand Factor a *Cd163* - CD163 molecule) byla provedena kontrola genové exprese pomocí qPCR, jako referenční gen byl zvolen *Ppia* (viz. 4.3.2.2).

5.5 Analýza regulačních uzlů

S využitím programu Ingenuity Pathway Analysis (IPA) byla identifikována síť potenciálních regulačních uzlů zodpovědných za změny v metabolismu lipidů u kmene BN-Lx.SHR4 pod vlivem vysokosacharóзовé diety.



© 2000-2020 QIAGEN. All rights reserved.

Obrázek 28: Analýza regulačních uzlů v metabolismu lipidů u kmene BN-Lx.SHR4 pod vlivem HSD pomocí programu IPA

Zobrazeny jsou uzly s nejvyšším skóre v analýze mechanistických uzlů, použity jsou transkripty se signifikantními hodnotami ve změně exprese v porovnání kmene BN-Lx.SHR4 oproti BN-Lx pod vlivem HSD. Signifikantní změna exprese směrem dolů je znázorněna zeleně, směrem nahoru červeně.

Ve žlutém rámečku je protein *ApoBec1*, který se zároveň nachází v diferenciatním segmentu BN-Lx.SHR4. Zvýšená exprese jeho genu reguluje expresi HDL, konkrétně ji snižuje.

6 Diskuze

6.1 Genetická charakterizace kmene BN-Lx.SHR4

Pomocí podrobné genotypizace se nám podařilo ověřit kongenicitu nově ustaveného dvojité kongenního kmene BN-Lx.SHR4, tedy BN.PD-(D8Rat39-D8Rat35),SHR-(D4Mgh30-D4Rat203). Také se podařilo identifikovat geny SHR původu, které se nachází v diferenciálním segmentu na 4. chromozomu dvojité kongenního kmene BN-Lx.SHR4 (viz 5.1). Ačkoli je v Rat Genome Database anotováno více než 30 kongenních kmenů s diferenciálními úseky překrývajícími diferenciální úsek BN-Lx.SHR4, ani jeden z nich neobsahuje tuto genomickou oblast od kmene SHR. Jedná se tedy o první model pro zkoumání vlivu tohoto úseku chromozomu 4 a QTL zde zjištěných u spontánně hypertenzního potkana. Pomocí *in silico* analýzy a transkriptomické analýzy kmenů pod vlivem rozdílných diet se povedlo identifikovat geny, které potenciálně mohou souviset s fenotypem metabolického syndromu.

6.1.1 Kandidátní geny

6.1.1.1 *Ankrd26*

Ankrd26 (Ankyrin Repeat Domain 26) je spojen s rozvojem obezity a diabetu (Liu et al. 2012). Jeho snížená exprese byla identifikována v souvislosti se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních a metabolických abnormalit u obézních jedinců (Desiderio et al. 2019).

Myší model s parciální inaktivací *Ankrd26* vykazoval extrémní obezitu, inzulinovou rezistenci a známky gigantismu (Bera et al. 2008).

Pomocí *in silico* analýzy byla odhalena potenciálně ztrátová mutace tohoto genu v genomu SHR, potažmo BN-Lx.SHR4 (viz. 5.2). Celkově jsme v tomto genu zjistili 9 různých variant SHR původu. Vzhledem k tomu, že jsme pomocí transkriptomické analýzy nezaznamenali odlišnou expresi *Ankrd26* na úrovni mRNA, bude třeba v další studii jednak konfirmovat samotnou mutaci a ověřit proteinový produkt mutovaného genu.

6.1.1.2 *Apobec1*

Apobec1 (Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 1) kóduje enzym editující apoB mRNA, čímž ovlivňuje tvorbu chylomikronů, LDL a VLDL. Editace apoB

mRNA u potkana se zvyšuje při příjmu sacharidů, etanolu, administraci inzulínu nebo růstového hormonu a snižuje se v době hladovění (Greeve 2005).

Ve studii zaměřené na korejskou populaci byla variantní alela genu *Apobec1* vyhodnocena jako rizikový faktor pro rozvoj MetS, převážně kvůli vzniku dyslipidémie. Toto riziko je ještě více podpořeno stravou s vysokým obsahem sacharidů (Zhou et al. 2019).

Expresa *APOBEC1* byla u BN-*Lx*.SHR4 (oproti BN-*Lx*) zvýšená jak za podmínek STD, tak i při HSD, kdy byla exprese ještě vyšší (viz *Tabulka 23*).

6.1.1.3 *Ccdc77*

U genu *Ccdc77* (Coiled-coil domain containing 77), jehož proteinový produkt je lokalizován na centrosomu, byla nalezena potenciální nesynonymní záměna (a 5 dalších variant), současně jsme zaznamenali mnohonásobně zvýšenou expresi u kmene BN-*Lx*.SHR4 při obou typech diet.

Tento gen není téměř vůbec v odborné literatuře popsán, ani na základě podobných genů není v současné době možné formulovat hypotézu o případném mechanismu působení tohoto genu na pozorované rozdílné morfometrické a metabolické parametry. *Ccdc77* tak představuje vzhledem k výše zmíněným výsledkům zajímavé téma pro detailnější studium ve vztahu k metabolickému syndromu.

6.1.1.4 *Cd163*

Cd163 (Cluster of Differentiation 163) kóduje membránový glykoproteinový receptor patřící do skupiny scavenger receptorů bohatých na cysteinové zbytky. Tento receptor, který je specifický pro linii monocytů a makrofágů váže komplex haptoglobin-hemoglobin (Kristiansen et al. 2001).

Zvýšením exprese *Cd136* dochází k produkci prozánětlivých cytokinů (Fabriek et al. 2009). Hladina CD136 v krvi také souvisí s obezitou a diabetem 1. typu (Svart et al. 2019). Tchaj-wanská studie zároveň prokázala vztah mezi CD163 a dietními opatřeními při rozvoji MetS (Hu et al. 2019).

U BN-*Lx*.SHR4 (oproti kontrolnímu kmeni) byla významně nižší exprese tohoto genu za podmínek STD, po podání HSD byly exprese *Cd163* v játrech obou kmenů srovnatelné. Na úrovni DNA jsme identifikovali 4 varianty v exonech (zejména synonymní záměny) a 5 v intronech.

6.1.1.5 Geny komplexu C1 – *C1s*, *C1r*, *C1rl*

Imunitní systém úzce souvisí s metabolickými poruchami v tukové tkáni, játrech a hraje také roli při inzulinové rezistenci. Hlavní komponentou přirozené imunity je komplementová kaskáda. Tato kaskáda může být aktivována několika způsoby: klasickou, aletrnativní a lektinovou cestou. Právě klasická kaskáda je iniciována aktivací komplexu C1. K tomu dochází například navázáním imunitního komplexu nebo C reaktivního proteinu na C1q molekulu, která aktivuje serinovou proteázu C1r. Ta aktivuje další serinovou proteázu C1s, která štěpí C2 a C4 a dochází k formování C3 konvertázy, čímž kaskáda, na jejímž konci je buněčná proliferace nebo lýza, pokračuje (Vlaicu et al. 2016; Shim et al. 2020).

Při diabetu 2. typu dochází kvůli zvýšené cirkulaci volných nenasycených mastných kyselin k ektopické akumulaci amyloidních fibril, které mohou vyvolat aktivaci C1q s následným cytotoxickým efektem na pankreatické buňky (Sjölander et al. 2012).

V diferenciální segmentu na 4. chromozomu BN-*Lx*.SHR4 jsou kódovány geny účastnící se aktivace komplementu – *C1r*, *C1s* a také *C1rl*.

Analog serinové proteázy *C1rl* vykazuje taktéž proteolytickou aktivitu a potenciálně může štěpit *C1s* (Ligoudistiainou et al. 2005). Mimo jiné byla také zaznamenána asociace exprese *C1rl* s obezitou a zvýšenou hladinou glukózy a lipidů v krvi (Chang et al. 2019).

U těchto tří genů byla při HSD (oproti STD) nalezena signifikantně zvýšená exprese, a to jak u BN-*Lx*, tak i u BN-*Lx*.SHR4. To napovídá, že dieta s vysokým obsahem sacharidů má vliv na aktivaci komplementové kaskády.

6.1.1.6 *Lpcat3*

Lpcat3 (Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3) kóduje enzym, který katalyzuje reacylaci lysofosfolipidů na fosfolipidy. Lysofosfolipy ovlivňují metabolismus lipidů a glukózy tím, že snižují mitochondriální oxidaci mastných kyselin v játrech (Labonté et al. 2010). Vyřazením aktivity enzymu *Lpcat3* dochází k hepatosteatóze, vysoké koncentraci VLDL a nízké koncentraci triacylglycerolů v plazmě (Rong et al. 2015). Naopak při vyšší expresi *Lpcat3* se zvyšuje hladina HDL v plazmě a to s sebou přináší metabolické a kardiovaskulární benefity (Cash and Hui 2016). Pomocí etnicky-specifické GWAS byla také nalezena spojitost mezi *Lpcat3* a metabolismem lipidů v korelaci s obsahem mononenasyčených mastných kyselin v dietě (Hu et al. 2017).

Při HSD byla u obou kmenů potkana snižena exprese tohoto genu.

6.1.1.7 *Ptpn6*

Gen *Ptpn6* (Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 6) kódující enzym, který patří do rodiny protein-tyrozinových fosfatáz reguluje množství buněčných procesů, včetně buněčného růstu (Dubois et al. 2006).

U modelového organismu Dánie pruhované bylo zdokumentováno, že hyperinzulinémie vede k inzulinové rezistenci prostřednictvím *Ptpn6*. (Marín-Juez et al. 2014).

V porovnání s kontrolním kmenem byla exprese *Ptpn6* vyšší u BN-*Lx*.SHR4 a to při obou typech diet. Na úrovni DNA jsme našli pouze jednu variantu v exonu (synonymní záměna) a jednu jednonukleotidovou delecii v intronu.

6.1.1.8 *Scnn1a*

Scnn1a (Sodium Channel Epithelial 1 Subunit Alpha) kóduje α podjednotku epiteliálního sodíkového kanálu a jeho exprese tak podporuje sodíkovou propustnost. Tyto epiteliální sodíkové kanály hrají roli při regulaci krevního tlaku v mozku a jsou asociovány s kardiovaskulárními chorobami (Sharma et al. 2017). Nalezena byla také asociace mezi variantní alelou *Scnn1a* a MetS (Goulart et al. 2009).

Scnn1a byl signifikantně exprimován u BN-*Lx*.SHR4 (oproti BN-*Lx*) u obou diet.

6.1.1.9 *Slc6a13*

Slc6a13 (Solute Carrier Family 6 Member 13) patří mezi GABA transportéry, produkují ho převážně hepatocyty a je asociován s metabolickými poruchami v ledvinách (Köttgen et al. 2010). Je také zodpovědný za přenos taurinu z krve do hepatocytů (Ikeda et al. 2012). Taurin je esenciální složka pro tvorbu žluči, která se podílí na intestinální absorpci tuků a vitamínů rozpustných v tucích (Birdsall 1998).

6.1.1.10 *Vwf*

Vwf, gen pro von Willebrandův faktor, kóduje glykoprotein účastnící se hemokoagulace a je asociován se srdečními chorobami (Petricevic et al. 2018). Jeho exprese také negativně koreluje s hladinou adiponektinu v krvi (Spurná et al. 2018). Byla také nalezena souvislost mezi dietárními opatřeními (konkrétně suplementací vitamínu D) a snížením hladiny VWF u pacientů s MetS (Tabrizi et al. 2018).

U DNA sekvence BN-*Lx*.SHR4 byla zaznamenána nesynonymní záměna v genu *Vwf* a současně signifikantně nižší exprese ve srovnání s BN-*Lx* u potkanů krmených standardní dietou.

6.1.2 Ostatní geny v diferenciatním segmentu

U několika dalších genů nacházejících se v diferenciatním segmentu na 4. chromozomu potkana byla také zaznamenána signifikantní změna exprese. Jsou to například geny uplatňující se při remodelaci chromatinu (*Cecr2*) nebo vazbě k chromatinu (*Ncapd2*). Dále také při regulaci oprav DNA (*Rad52*) nebo regulaci transkripce (*Myf2*, *Chd4*) a translace (*Mrp51*). V neposlední řadě také při depolymerizaci aktinu (*Mical3*), ubikvitinaci (*Spsb2*, *Ltbr*), enzymové aktivaci (*Dcp1b*), proteinové autofosforylaci (*Wnk1*) nebo regulaci imunitního systému (*Ptms*, *Tapbpl*, *Ltbr*) [zdroj: RGD, <http://rgd.mcw.edu>, přístup dne 12.4.2020]. Tyto geny nicméně doposud nebyly žádnou studií asociovány přímo s metabolickým syndromem.

6.2 Metabolický profil BN-Lx.SHR4

Podářilo se stanovit relativně podrobný metabolický profil dospělých samců kmenů BN-Lx a BN-Lx.SHR4 pod vlivem standardní a vysokosacharóзовé diety. U řady parametrů významných z hlediska patogeneze metabolického syndromu byly nalezeny statisticky signifikantní rozdíly, ať už mezi kmeny, mezi oběma dietami nebo přímo nutrigenetické interakce svědčící pro kombinované působení genetických a dietních faktorů.

První nutrigenetickou interakci jsme zaznamenali u tělesné hmotnosti, kdy kmen BN-Lx ve shodě s dříve publikovanými výsledky (Šeda et al. 2006) nezvýšil na rozdíl od BN-Lx.SHR4 svou hmotnost vlivem podání HSD, i když u obou kmenů HSD vedla k očekávanému zvýšení adipozity.

BN-Lx.SHR4 má prokazatelně lepší glukózovou toleranci za podmínek STD i HSD při srovnatelné inzulinémii. Ačkoli ze získaných dat není možné přesně identifikovat variantu genu nebo genů v diferenciálním segmentu BN-Lx.SHR4, které jsou za tento efekt odpovědné (ať už přímo, případně v interakci s dalšími geny segmentu nebo genetického pozadí BN původu), systematicky rozdílnou expresi bez ohledu na dietu vykázaly především geny *Apobec1*, *Cdccc77*, *Mlf2*, *Ptpn6* a *Scnn1a*.

6.2.1 Kontext metabolického profilu

HDL transportují cholesterol z periferních tkání do jater a jeho hladina negativně koreluje s rizikem kardiovaskulárních onemocnění (Saklayen 2018). Naopak vyšší koncentrace LDL má negativní účinky a přispívá vzniku aterosklerózy a řadí se tedy mezi rizikové faktory pro MetS (viz 2.1.2.4). U BN-Lx jsme pozorovali rizikovější distribuci cholesterolu a triacylglycerolů v porovnání s BN-Lx.SHR4.

Při STD je patrná vyšší koncentrace prozánětlivých cytokinů (IL1b, IL2, IL6 a IL18) u BN-Lx.SHR4, po podání HSD tento rozdíl již není patrný, což je reflektováno zjištěnou signifikantní nutrigenetickou interakcí pro IL2, IL6 a IL 18.

IL1b a IL18 patří do rodiny IL-1 a mají prozánětlivé účinky. Jejich působení je také asociováno s diabetickou retinopatií a působení IL18 pak navíc ještě s angiogenezí (Wooff et al. 2019; Campbell et al. 2014). IL2 hraje podstatnou roli u autoimunitních onemocnění, včetně diabetu 1. typu. Nízké dávky IL2 aktivují Treg buňky a mají tak pozitivní účinky na tento typ onemocnění (Rosenzweig et al. 2014). Dalším interleukinem, asociovaným s diabetem 1. i 2. typu, je IL6. Ten také ovlivňuje homeostázu glukózy (Sullivan 2004). Taktéž

snížená hladina IL7 v krvi působí protektivně při rozvoji diabetu 1. typu (Seyfarth et al. 2018). Snížená hladina IL7 má potenciálně protektivní účinky při inzulinové rezistenci. Signifikantní nárůst koncentrací IL17 po podání HSD je ve shodě s opakovanými pozorováními, že nadprodukce IL17 je následkem adipogeneze (Ahmed and Gaffen 2010).

Dalším mediátorem stimulujícím imunitní procesy je IFNG, který je jednou s efektorových molekul, jejichž vzájemné působení vede k smrti β buněk pankreatu a tedy i autoimunitnímu diabetu (Suk et al. 2001). IFNG byl signifikantně vyšší pod vlivem STD u BN-*Lx*.SHR4.

Důležitými hormony v patogenezi metabolického syndromu jsou inzulin a glukagon. Glukagon je peptidový hormon, který je produkován α buňkami pankreatu a zvyšuje hladinu glukózy v krvi. Inzulin funguje opačným způsobem, tedy umožňuje vstup glukózy do buňky (viz 2.1.2.2).

Hormony, které také hrají významnou roli při vzniku hyperglykémie, diabetu a tedy i samotného MetS, jsou adiponektin a leptin. Hladina adiponektinu pozitivně koreluje s inzulinovou senzitivitou a leptin suprimuje chuť k jídlu (viz 2.1.3.3). Samci kmene BN-*Lx*.SHR4 reagovali na podání HSD významným nárůstem koncentrací adiponektinu i leptinu na rozdíl od kmene BN-*Lx*. Koncentrace těchto adipokinů je závislá na objemu tělesného tuku, ten se se zvýšil u retroperitoneálního tukového tělesa výhradně u BN-*Lx*.SHR4.

Zároveň měl při HSD dvojité kongenní kmen nižší koncentraci PP a PYY. Pankreatický polypeptid (PP) je produkován buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní (Lonovics et al. 1981). Nižší hladina PP je také asociována se sníženou chutí k jídlu (Batterham et al. 2003). Dalším peptidem produkováným v gastrointestinálním traktu, konkrétně v mukotických L buňkách, je PYY. Jeho koncentrace je opět spojována s příjmem potravy – při hladovění je koncentrace nižší a zvyšuje se po jídle (Murphy and Bloom 2006).

6.3 Limitace provedených experimentů

Výsledky experimentů a analýz prezentované v této diplomové práci představují první charakterizaci nového dvojitě kongenního kmene BN-*Lx*.SHR4. Přes řadu získaných informací o nutrigenetických aspektech patogeneze metabolického syndromu je zřejmé, že prezentovaná data jsou omezena konkrétním nastavením protokolu a analýz. Zvolené kontrolní i experimentální skupiny byly tvořeny pouze dospělými samci obou kmenů. Opakovaně bylo prokázáno, že genetická architektura metabolického syndromu a jeho komponent je pohlavně specifická (Šeda et al. 2008; Weiss et al. 2006; Norheim et al. 2019). Dá se tedy předpokládat, že pokud by výsledky byly získány u samic obou kmenů, případně jiných fázích ontogeneze, neodpovídaly by nezbytně rozdíly mezi oběma kmeny těm zde prezentovaným. Pro detailní charakterizaci vlivu genů obsažených v diferenciálním segmentu na aspekty metabolického syndromu bude proto nezbytné rozšířit experimentální skupiny právě o samice potkanů a zvířata v různých věkových kategoriích.

Dále byla zvolena jen jedna dieta navozující MetS, která byla podávána v poměrně krátkém intervalu 14 dní. Ačkoli tento protokol je založen na řadě předchozích obdobných experimentů, jedná se u výsledků po ovlivnění HSD o víceméně důsledek akutního inzultu. Jak je uvedeno v kapitole 2.1.5, diety s různým obsahem a typem sacharidů a tuků mají různé dopady na metabolické procesy a značné rozdíly byly pozorovány také mezi chronickou a akutní expozicí těmto dietám (London et al. 2017).

Zjištěné genetické varianty pomocí *in silico* porovnání genomické sekvence progenitorů jsou vhodným prvotním filtrem při hledání kauzálních variant zodpovědných za zjištěné rozdíly ve fenotypovém profilu obou kmenů. Musí ale následně být ověřeny přímou sekvenací DNA kmene BN-*Lx*.SHR4 a případné dopady na expresi genů testovány v odpovídajících tkáních na úrovni mRNA i proteinů. Játra byla zvolena pro transkriptomickou analýzu jako orgán s zásadní důležitostí pro metabolismus, podobně žádoucí je ale i zjištění exprese v tukové tkáni, kosterním svalu a dalších tkáních relevantních pro patogenezi MetS (viz 2.1.2).

7 Závěr

Metabolický syndrom je komplexním a prevalentním onemocněním moderního světa, na jehož etiologii se podílí environmentální i genetické faktory. Přístupy k porozumění tohoto onemocnění tedy zákonitě také musí být víceúrovňové. Jedním z těchto přístupů je také nutrigenomika, která dává do souvislosti složky výživy s genomem, klíčové jsou také další metody systémové genetiky.

V rámci této diplomové práce jsem charakterizovala genetické pozadí nového dvojité kongenního potkaního kmene BN-*Lx*.SHR4, jež je zároveň prvním kmenem, který obsahuje tuto genomovou oblast původem od SHR (viz 5.1) a zhodnotila jsem jeho genom v kontextu diet o různém obsahu sacharidů.

Pomocí transkriptomických metod a *in silico* analýzy se navíc dále podařilo identifikovat potenciální kandidátní geny - *Apobec1*, *Cdccc77*, *Mlf2*, *Ptpn6* a *Scnn1a* asociované s MetS a nacházející se v diferenciálním segmentu (viz 6.1.1).

V neposlední řadě jsem analyzovala metabolický profil potkanů BN-*Lx*.SHR4 a BN-*Lx* pod vlivem standardní a vysokosacharóзовé diety. Metabolický profil dokazuje, že dvojité kongenní kmen BN-*Lx*.SHR4 skutečně vykazuje signifikantní alternace v metabolismu a v koncentraci mediátorů imunitního systému (viz 5.3). Tyto změny jsou vesměs pozitivní (oproti kontrolnímu kmeni BN-*Lx*) ve vztahu k rozvoji MetS a některé z nich jsou navíc ovlivněné typem diety. Je tedy zřejmé, že zde opravdu dochází k nutrigenetickým interakcím.

Závěrem lze říci, že nově ustanovený kmen BN-*Lx*.SHR4, tedy BN.PD-(D8Rat39-D8Rat35),SHR-(D4Mgh30-D4Rat203), může být vhodným modelovým organismem pro další zkoumání metabolického syndromu a s ním spojených nutrigenetických interakcí.

8 Seznam použité literatury

ABOU ZIKI, Maen and Arya MANI, 2017. Metabolic Syndrome: Genetic Insights into Disease Pathogenesis HHS Public Access. *Physiology & behavior* [online]. **176**(5), 139–148. Available at: doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040

AHMED, Mushtaq and Sarah L. GAFFEN, 2010. IL-17 in obesity and adipogenesis. *Cytokine and Growth Factor Reviews* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, **21**(6), 449–453. ISSN 13596101. Available at: doi:10.1016/j.cytogfr.2010.10.005

AITMAN, Tim, Paraminder DHILLON and Aron M. GEURTS, 2016. A RATIONAL choice for translational research? *Disease Models & Mechanisms* [online]. **9**(10), 1069–1072. ISSN 1754-8403. Available at: doi:10.1242/dmm.027706

AITMAN, Timothy J., et al., 1999. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nature Genetics* [online]. **21**(1), 76–83. ISSN 10614036. Available at: doi:10.1038/5013

ALBERTI, K. G.M.M., et al., 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International . *Circulation* [online]. **120**(16), 1640–1645. ISSN 00097322. Available at: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644

ALMAAS, Eivind, 2007. Biological impacts and context of network theory. *Journal of Experimental Biology* [online]. **210**(9), 1548–1558. ISSN 00220949. Available at: doi:10.1242/jeb.003731

BARABÁSI, Albert László and Zoltán N. OLTVAI, 2004. Network biology: Understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics* [online]. **5**(2), 101–113. ISSN 14710056. Available at: doi:10.1038/nrg1272

BARONI, M. G., M. ARCA, F. SENTINELLI, R. BUZZETTI, F. CAPICI, S. LOVARI, M. VITALE, S. ROMEO and U. DI MARIO, 2001. The G972R variant of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene, body fat distribution and insulin-resistance. *Diabetologia* [online]. **44**(3), 367–372. ISSN 0012186X. Available at: doi:10.1007/s001250051628

BATTERHAM, R. L., et al., 2003. Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* [online]. **88**(8), 3989–3992. ISSN 0021972X. Available at: doi:10.1210/jc.2003-030630

BENRICK, Anna, Belén CHANCLÓN, Peter MICALLEF, Yanling WU, Laila HADI, John M. SHELTON, Elisabet STENER-VICTORIN and Ingrid Wernstedt ASTERHOLM, 2017. Adiponectin protects against development of metabolic disturbances in a PCOS mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **114**(34), E7187–E7196. ISSN 10916490. Available at: doi:10.1073/pnas.1708854114

BERA, Tapan K., Xiu Fen LIU, Masanori YAMADA, Oksana GAVRILOVA, Eva MEZEY, Lino TESSAROLLO, Miriam ANVER, Yoonsoo HAHN, Byungkook LEE and Ira PASTAN, 2008. A

model for obesity and gigantism due to disruption of the Ankrd26 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **105**(1), 270–275. ISSN 00278424. Available at: doi:10.1073/pnas.0710978105

BIRDSALL, Timothy C., 1998. Therapeutic applications of taurine. *Alternative Medicine Review*. **3**(2), 128–136. ISSN 10895159.

BONEN, Arend, Shannon E. CAMPBELL, Carley R. BENTON, Adrian CHABOWSKI, Susan L. M. COORT, Xiao-Xia HAN, Debby P. Y. KOONEN, Jan F. C. GLATZ and Joost J. F. P. LUIKEN, 2004. Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. *Proceedings of the Nutrition Society* [online]. **63**(2), 245–249. ISSN 0029-6651. Available at: doi:10.1079/pns2004331

BROMAN, Karl W., 2005. The genomes of recombinant inbred lines. *Genetics* [online]. **169**(2), 1133–1146. ISSN 00166731. Available at: doi:10.1534/genetics.104.035212

CAMPBELL, Matthew, Sarah DOYLE and Peter HUMPHRIES, 2014. IL-18: A new player in immunotherapy for age-related macular degeneration? *Expert Review of Clinical Immunology* [online]. **10**(10), 1273–1275. ISSN 17448409. Available at: doi:10.1586/1744666X.2014.950231

CARLSSON, Emma, Peter ALMGREN, Johan HOFFSTEDT, Leif GROOP and Martin RIDDERSTRÅLE, 2004. The FOXC2 C-512T polymorphism is associated with obesity and dyslipidemia. *Obesity Research* [online]. **12**(11), 1738–1743. ISSN 10717323. Available at: doi:10.1038/oby.2004.215

CASH, J. G. and D. Y. HUI, 2016. Liver-specific overexpression of LPCAT3 reduces postprandial hyperglycemia and improves lipoprotein metabolic profile in mice. *Nutrition & diabetes* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, **6**(March), e206. ISSN 20444052. Available at: doi:10.1038/nutd.2016.12

CIVELEK, Mete and Aldons J. LUSIS, 2014. Systems genetics approaches to understand complex traits. *Nature Reviews Genetics* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, **15**(1), 34–48. ISSN 14710056. Available at: doi:10.1038/nrg3575

CRUZ SOUZA, Ellen M. S., M. Juliana BITENCOURT DE MORAIS, Carlos VINÍCIUS DALTO DA ROSA and Mellina DA SILVA, 2020. Long-term sucrose solution consumption causes metabolic alterations and affects hepatic oxidative stress in Wistar rats [online]. 1–8. Available at: doi:10.1242/bio.047282

DAGDAN, Batnaran, Ariunbold CHULUUN-ERDENE, Orgil SENGERAGCHAA, Munkhzol MALCHINKHUU and Munkhtsetseg JANLAV, 2018. Leptin Gene G2548A Polymorphism among Mongolians with Metabolic Syndrome. *Medical Sciences* [online]. **7**(1), 3. ISSN 2076-3271. Available at: doi:10.3390/medsci7010003

DELAVARI, Alireza, Mohammad Hossein FOROUZANFAR, Siamak ALIKHANI, Afsaneh SHARIFIAN and Roya KELISHADI, 2009. First nationwide study of the prevalence of the metabolic syndrome and optimal cutoff points of waist circumference in the middle east: The national survey of risk factors for noncommunicable diseases of Iran. *Diabetes Care* [online]. **32**(6), 1092–1097. ISSN 01495992. Available at: doi:10.2337/dc08-1800

DELLES, Christian, Martin W. MCBRIDE, Delyth GRAHAM, Sandosh PADMANABHAN and Anna F. DOMINICZAK, 2010. Genetics of hypertension: From experimental animals to humans.

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease [online]. B.m.: Elsevier B.V., **1802**(12), 1299–1308. ISSN 09254439. Available at: doi:10.1016/j.bbadis.2009.12.006

DESCAMPS, Olivier S., et al., 2019. Evolving concepts on the management of dyslipidaemia. *Acta Clinica Belgica: International Journal of Clinical and Laboratory Medicine* [online]. **75**(1), 80–90. ISSN 22953337. Available at: doi:10.1080/17843286.2019.1702823

DESIDERIO, Antonella, et al., 2019. Epigenetic silencing of the ANKRD26 gene correlates to the pro-inflammatory profile and increased cardio-metabolic risk factors in human obesity. *Clinical Epigenetics* [online]. B.m.: Clinical Epigenetics, **11**(1), 1–14. ISSN 18687083. Available at: doi:10.1186/s13148-019-0768-0

DUBOIS, Marie Julie, et al., 2006. The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nature Medicine* [online]. **12**(5), 549–556. ISSN 10788956. Available at: doi:10.1038/nm1397

DUVNJAK, L. and M. DUVNJAK, 2009. The metabolic syndrome - an ongoing story. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. **60 Suppl 7**, 19–24. ISSN 18991505.

FABRIEK, Babs O., et al., 2009. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* [online]. **113**(4), 887–892. ISSN 00064971. Available at: doi:10.1182/blood-2008-07-167064

FÁBRY, P., R. POLEDNE, L. KAZDOVÁ and T. BRAUN, 1968. The effect of feeding frequency and type of dietary carbohydrate on hepatic lipogenesis in the albino rat. *Nutr Dieta Eur Rev Nutr Diet* [online]. **10**(2), 81–90. ISSN 00280836. Available at: doi:10.1159/000175212

FATHI DIZAJI, Behdokht, 2018. The investigations of genetic determinants of the metabolic syndrome. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* [online]. B.m.: Diabetes India, **12**(5), 783–789. ISSN 18780334. Available at: doi:10.1016/j.dsx.2018.04.009

FEHER TURKOVIC, Lana, Alica PIZENT, Slavica DODIG, Mladen PAVLOVIC and Daria PASALIC, 2012. FABP 2 gene polymorphism and metabolic syndrome in elderly people of Croatian descent. *Biochemia Medica* [online]. **22**(2), 217–224. ISSN 1330-0962. Available at: doi:10.11613/bm.2012.024

FERRANNINI, Eleuterio and Andrea NATALI, 1991. Essential hypertension, metabolic disorders, and insulin resistance. *American Heart Journal* [online]. **121**(4 PART 2), 1274–1282. ISSN 10976744. Available at: doi:10.1016/0002-8703(91)90433-I

FOSS, Eric J., Dragan RADULOVIC, Scott A. SHAFFER, Douglas M. RUDERFER, Antonio BEDALOV, David R. GOODLETT and Leonid KRUGLYAK, 2007. Genetic basis of proteome variation in yeast. *Nature Genetics* [online]. **39**(11), 1369–1375. ISSN 10614036. Available at: doi:10.1038/ng.2007.22

FRITTITTA, L., R. BARATTA, D. SPAMPINATO, R. DI PAOLA, A. PIZZUTI, R. VIGNERI and V. TRISCHITTA, 2001. The Q121 PC-1 variant and obesity have additive and independent effects in causing insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* [online]. **86**(12), 5888–5891. ISSN 0021972X. Available at: doi:10.1210/jcem.86.12.8108

GAUGUIER, Dominique, 2016. Application of quantitative metabolomics in systems genetics in rodent models of complex phenotypes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. B.m.: Elsevier Inc, **589**, 158–167. ISSN 10960384. Available at: doi:10.1016/j.abb.2015.09.016

GEORGES, Michel, 1997. QTL mapping to QTL cloning: Mice to the rescue. *Genome Research* [online]. **7**(7), 663–665. ISSN 10889051. Available at: doi:10.1101/gr.7.7.663

GHAZALPOUR, Anatole, et al., 2011. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genetics* [online]. **7**(6). ISSN 15537390. Available at: doi:10.1371/journal.pgen.1001393

GIBBS, Richard A., et al., 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* [online]. **428**(6982), 493–520. ISSN 00280836. Available at: doi:10.1038/nature02426

GOULART, Alessandra, Kathryn REXRODE, Suzanne CHENG, Lynda ROSE, Julie BURING, Paul RIDKER and Robert ZEE, 2009. Association of Genetic Variants with the Metabolic Syndrome in 20,806 Caucasian Women: The Women's Health Genome Study Alessandra. *American Heart Journal* [online]. **23**(1), 1–7. ISSN 15378276. Available at: doi:10.1038/jid.2014.371

GREEVE, J., 2005. Inhibition of the synthesis of apolipoprotein b-containing lipoproteins. *Handbook of Experimental Pharmacology* [online]. **170**, 483–517. ISSN 01712004. Available at: doi:10.1007/3-540-27661-0-18

GRUNDY, Scott M., 2006. Drug therapy of the metabolic syndrome: Minimizing the emerging crisis in polypharmacy. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. **5**(4), 295–309. ISSN 14741776. Available at: doi:10.1038/nrd2005

HALES, Nicholas C. and David J. P. BARKER, 2001. The thrifty phenotype hypothesis revisited. *Diabetologia* [online]. **55**(8), 2085–2088. ISSN 0012186X. Available at: doi:10.1007/s00125-012-2589-y

HASLAM, David W., 2005. Obesity. *Lancet* [online]. 1197–1209. Available at: doi:10.1016/S0140-6736(05)67483-1

HEIJMANS, Bastiaan T., et al., 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **105**(44), 17046–17049. ISSN 00278424. Available at: doi:10.1073/pnas.0806560105

HODÚLOVÁ, Miloslava, et al., 2014. Genomic determinants of triglyceride and cholesterol distribution into lipoprotein fractions in the rat. *PLoS ONE* [online]. **9**(10). ISSN 19326203. Available at: doi:10.1371/journal.pone.0109983

HU, Tzu Yu, et al., 2019. Soluble CD163-associated dietary patterns and the risk of metabolic syndrome. *Nutrients* [online]. **11**(4), 1–14. ISSN 20726643. Available at: doi:10.3390/NU11040940

HU, Yao, et al., 2017. Discovery and fine-mapping of loci associated with MUFAs through trans-ethnic meta-analysis in Chinese and European populations. *Journal of Lipid Research* [online]. **58**(5), 974–981. ISSN 15397262. Available at: doi:10.1194/jlr.P071860

CHANG, Chia-Yu, Yu-Tang TUNG, Yen-Kuang LIN, Chen-Chung LIAO, Ching-Feng CHIU, Te-Hsuan TUNG, Amalina SHABRINA and Shih-Yi HUANG, 2019. Effects of Caloric Restriction

with Protein Supplementation on Plasma Protein Profiles in Middle-Aged Women with Metabolic Syndrome—A Preliminary Open Study. *Journal of Clinical Medicine* [online]. **8**(2), 195. ISSN 2077-0383. Available at: doi:10.3390/jcm8020195

IKEDA, Saori, Masanori TACHIKAWA, Shin Ichi AKANUMA, Jun FUJINAWA and Ken Ichi HOSOYA, 2012. Involvement of γ -aminobutyric acid transporter 2 in the hepatic uptake of taurine in rats. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* [online]. **303**(3), 291–297. ISSN 01931857. Available at: doi:10.1152/ajpgi.00388.2011

IVANOVA, Ekaterina A., Veronika A. MYASOEDOVA, Alexandra A. MELNICHENKO, Andrey V. GRECHKO and Alexander N. OREKHOV, 2017. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. **2017**. ISSN 19420994. Available at: doi:10.1155/2017/1273042

JIROUT, Martin, Drahomíra KŘENOVÁ, Vladimír KŘEN, Laura BREEN, Michal PRAVENEK, Nicholas J. SCHORK and Morton P. PRINTZ, 2003. A new framework marker-based linkage map and SDPs for the Rat HXB/BXH strain set. *Mammalian Genome* [online]. **14**(8), 537–546. ISSN 09388990. Available at: doi:10.1007/s00335-003-2266-z

KARIMI, Golgis, Zahra HEIDARI, Somayyeh FIROUZI and Fahimeh HAGHIGHATDOOST, 2020. A systematic review and meta-analysis of the association between fish consumption and risk of metabolic syndrome. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* [online]. B.m.: The societies SID, SISA and SINU and the Department of Clinical Medicine and Surgery at Federico II University in Italy. ISSN 09394753. Available at: doi:10.1016/j.numecd.2020.02.001

KASSI, Eva, Panagiota PERVANIDOU, Gregory KALTSAS and George CHROUSOS, 2011. Metabolic syndrome: Definitions and controversies. *BMC Medicine* [online]. **9**(Appendix 1), 1–13. ISSN 17417015. Available at: doi:10.1186/1741-7015-9-48

KAUR, Jaspinder, 2014. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice* [online]. **2014**. ISSN 20900597. Available at: doi:10.1155/2014/943162

KÖTTGEN, Anna, et al., 2010. Multiple New Loci Associated with Kidney Function and Chronic Kidney Disease: The CKDGen consortium. *Nature Genetics* [online]. **42**(5), 376–384. Available at: doi:10.1038/ng.568.Multiple

KOTZKA, Jorg and Dirk MÜLLER-WIELAND, 2004. Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1: Gene regulatory target for insulin resistance? *Expert Opinion on Therapeutic Targets* [online]. **8**(2), 141–149. ISSN 14728222. Available at: doi:10.1517/14728222.8.2.141

KRISHNA, R. G. and F. WOLD, 1993. Post-translational modification of proteins. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. **67**, 265–298. ISSN 0065258X.

KRISTIANSEN, Mette, Jonas H. GRAVERSEN, Christian JACOBSEN, Ole SONNE, Hans Jürgen HOFFMAN, S. K.Alex LAW and Søren K. MOESTRUP, 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* [online]. **409**(6817), 198–201. ISSN 00280836. Available at: doi:10.1038/35051594

KŘEN, V., 1975. Genetics of the polydactyly-luxate syndrome in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Univ Carol Med Monogr.* (68):1-103.

LAAKSO, Markku, 2004. Gene variants, insulin resistance, and dyslipidaemia. *Current Opinion in Lipidology* [online]. **15**(2), 115–120. ISSN 09579672. Available at: doi:10.1097/00041433-200404000-00004

LABONTÉ, Eric D., et al., 2010. Postprandial lysophospholipid suppresses hepatic fatty acid oxidation: the molecular link between group 1B phospholipase A 2 and diet-induced obesity. *The FASEB Journal* [online]. **24**(7), 2516–2524. ISSN 0892-6638. Available at: doi:10.1096/fj.09-144436

LAPPALAINEN, Tuuli, Michael SAMMETH, Marc FRIEDLÄNDER, Jean MONLONG and ET AL, 2013. Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans. *Nature* [online]. **501**(7468), 293–306. Available at: doi:10.1007/978-3-319-92642-1_13

LIGOUDISTIAINO, Christina, Yuanyuan XU, Gerard GARNIER, Antonella CIRCOLO and John E. VOLANAKIS, 2005. A novel human complement-related protein, C1r-like protease (C1r-LP), specifically cleaves pro-C1s. *Biochemical Journal* [online]. **387**(1), 165–173. ISSN 02646021. Available at: doi:10.1042/BJ20041196

LIU, Dajiang L. and Et AL, 2011. Exome-wide association study of plasma lipids in >300,000 individuals. *Physiology & behavior* [online]. **176**(1), 139–148. Available at: doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040

LIU, Xiu Fen, Tapan K. BERA, Charissa KAHUE, Thelma ESCOBAR, Zhaoliang FEI, Gregory A. RACITI and Ira PASTAN, 2012. ANKRD26 and its interacting partners TRIO, GPS2, HMMR and DIPA regulate adipogenesis in 3T3-L1 cells. *PLoS ONE* [online]. **7**(5). ISSN 19326203. Available at: doi:10.1371/journal.pone.0038130

LONDON, Edra, Maria NESTEROVA and Constantine A. STRATAKIS, 2017. Acute vs chronic exposure to high fat diet leads to distinct regulation of PKA. *Journal of molecular endocrinology* [online]. **59**(1), 1–12. ISSN 14796813. Available at: doi:10.1530/JME-16-0188

LONOVICS, Janos, Peter DEVITT, Larry WATSON, Phillip RAYFORD and James THOMPSON, 1981. Pancreatic Polypeptide. *Arch Surg.* **116**.

LOW WANG, Cecilia C, Marc L GOALSTONE and Boris DRAZNIN, 2004. Impact Cardiovascular Biology. *Diabetes.* **53**(November), 2735–2740.

LOZANO, Wilson M., Oscar J. ARIAS-MUTIS, Conrado J. CALVO, Francisco J. CHORRO and Manuel ZARZOSO, 2019. Diet-induced rabbit models for the study of metabolic syndrome. *Animals* [online]. **9**(7), 1–12. ISSN 20762615. Available at: doi:10.3390/ani9070463

LYON, Helen N., et al., 2007. The association of a SNP upstream of INSIG2 with body mass index is reproduced in several but not all cohorts. *PLoS Genetics* [online]. **3**(4), 0627–0633. ISSN 15537390. Available at: doi:10.1371/journal.pgen.0030061

MADSEN, Lise, Bjørn LIASET and Karsten KRISTIANSEN, 2008. *Macronutrients and obesity: Views, news and reviews* [online]. 2008. ISSN 17460875. Available at: doi:10.2217/17460875.3.1.43

MAMBIYA, Michael, et al., 2019. The Play of Genes and Non-genetic Factors on Type 2 Diabetes. *Frontiers in Public Health* [online]. **7**(November), 1–8. ISSN 22962565. Available at: doi:10.3389/fpubh.2019.00349

MARÍN-JUEZ, Rubén, Susanne JONG-RAADSEN, Shuxin YANG and Herman P. SPAINK, 2014. Hyperinsulinemia induces insulin resistance and immune suppression via Ptpn6/Shp1 in zebrafish. *Journal of Endocrinology* [online]. **222**(2), 229–241. ISSN 14796805. Available at: doi:10.1530/JOE-14-0178

MARKEL, Paul, Pei SHU, Chris EBELING, George A. CARLSON, Deborah L. NAGLE, John S. SMUTKO and Karen J. MOORE, 1997. Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nature Genetics* [online]. **17**(3), 280–284. ISSN 10614036. Available at: doi:10.1038/ng1197-280

MASHIMO, Tomoji, 2013. Gene targeting technologies in rats: ZFN, TALEN, and CRISPR. *Development, Growth & Differentiation*. **56**(1), 46–52.

MILAGRO, Fermín I., et al., 2012. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: Association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. *Chronobiology International* [online]. **29**(9), 1180–1194. ISSN 07420528. Available at: doi:10.3109/07420528.2012.719967

MORENO-MORAL, Aida and Enrico PETRETTO, 2016. From integrative genomics to systems genetics in the rat to link genotypes to phenotypes. *Disease Models & Mechanisms* [online]. **9**(10), 1097–1110. ISSN 1754-8403. Available at: doi:10.1242/dmm.026104

MURPHY, Kevin G. and Stephen R. BLOOM, 2006. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* [online]. **444**(7121), 854–859. ISSN 14764687. Available at: doi:10.1038/nature05484

NICA, Alexandra C. and Emmanouil T. DERMITZAKIS, 2013. Expression quantitative trait loci: Present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **368**(1620). ISSN 14712970. Available at: doi:10.1098/rstb.2012.0362

NOLAN, John J, Bernhard LUDVIK, Patricia BEERDSEN, Mary JOYCE and Jerrold OLEFSKY, 1994. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *The New England Journal of Medicine* [online]. **331**(13), 842–845. Available at: doi:10.1056/NEJM199411033311803

NORHEIM, Frode, et al., 2019. Gene-by-Sex Interactions in Mitochondrial Functions and Cardio-Metabolic Traits. *Cell Metabolism* [online]. B.m.: Elsevier Inc., **29**(4), 932-949.e4. ISSN 19327420. Available at: doi:10.1016/j.cmet.2018.12.013

OKAMOTO, Kozo and Aoki KYUZO, 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* [online]. **57**(534), 364–370. Available at: <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>

PALOMER, Xavier, Javier PIZARRO-DELGADO, Emma BARROSO and Manuel VÁZQUEZ-CARRERA, 2017. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, **29**(3), 178–190. ISSN 10432760. Available at: doi:10.1016/j.tem.2017.11.009

PAP, Attila, Ixchelt CUARANTA-MONROY, Matthew PELOQUIN and Laszlo NAGY, 2016. Is the mouse a good model of human PPAR γ -related metabolic diseases? *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **17**(8), 1–22. ISSN 14220067. Available at: doi:10.3390/ijms17081236

PARK, Joo-hyun, Moonyoung CHOI, Jung-Hun KIM, Jaemin KIM, Do-Hoon KIM, Yong-Gyu PARK, Kyungdo HAN and Bongsung KIM, 2020. Metabolic Syndrome and the Risk of Thyroid Cancer: A Nationwide Cohort Study. *SSRN Electronic Journal* [online]. 1–37. Available at: doi:10.2139/ssrn.3436296

PATTI, Gary J., Oscar YANES and Gary SIUZDAK, 2012. Metabolomics: the apogee of the omic triology. *Nature Reviews* [online]. **14**(June 2011), 2504. Available at: doi:10.1038/nrm3314.Metabolomics

PETRICEVIC, Mate, et al., 2018. Diagnosis and Management of Acquired von Willebrand Disease in Heart Disease: A Review of the Literature. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon* [online]. ISSN 0171-6425. Available at: doi:10.1055/s-0038-1673670

PETRŮ, Karolína. Interakce polymorfismů genu PPAR α se složkami diety v patogenezi diabetu mellitu 2. typu. 2018. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Vedoucí práce Šeda, Ondřej

PIGEYRE, Marie, Fereshteh T. YAZDI, Yuvreet KAUR and David MEYRE, 2016. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clinical Science* [online]. **130**(12), 943–986. ISSN 14708736. Available at: doi:10.1042/CS20160136

PRAVENEK, M., V. KŘEN, V. LANDA, P. MLEJNEK, A. MUSILOVÁ, J. ŠILHAVÝ, M. ŠIMÁKOVÁ and V. ZÍDEK, 2014. Recent progress in the genetics of spontaneously hypertensive rats. *Physiological Research*. **63**(SUPPL.). ISSN 08628408.

PULITI, Aldamaria, Gianluca CARIDI, Roberto RAVAZZOLO and Gian Marco GHIGGERI, 2007. Teaching molecular genetics: Chapter 4 - Positional cloning of genetic disorders. *Pediatric Nephrology* [online]. **22**(12), 2023–2029. ISSN 0931041X. Available at: doi:10.1007/s00467-007-0548-5

RANJAN, Koushlesh, Prasad MINAKSHI and Gaya PRASAD, 2016. Application of Molecular and Serological Diagnostics in Veterinary Parasitology. *The Journal of Advances in Parasitology* [online]. **2**(4), 80–99. Available at: doi:10.14737/journal.jap/2015/2.4.80.99

ROBERTA, D C, et al., 2020. Fish oil reverses metabolic syndrome , adipocyte dysfunction , and altered adipokines secretion triggered by high-fat diet-induced obesity [online]. 1–13. Available at: doi:10.14814/phy2.14380

ROMANOSKI, Casey E., et al., 2010. Systems Genetics Analysis of Gene-by-Environment Interactions in Human Cells. *American Journal of Human Genetics* [online]. B.m.: The American Society of Human Genetics, **86**(3), 399–410. ISSN 00029297. Available at: doi:10.1016/j.ajhg.2010.02.002

RONG, Xin, et al., 2015. Lpcat3-dependent production of arachidonoyl phospholipids is a key determinant of triglyceride secretion. *eLife* [online]. **2015**(4), 1–23. ISSN 2050084X. Available at: doi:10.7554/eLife.06557

ROSAS-VILLEGAS, Adriana, Mónica SÁNCHEZ-TAPIA, Azalia AVILA-NAVA, Victoria RAMÍREZ, Armando R. TOVAR and Nimbe TORRES, 2017. Differential effect of sucrose and fructose in combination with a high fat diet on intestinal microbiota and kidney oxidative stress. *Nutrients* [online]. **9**(4). ISSN 20726643. Available at: doi:10.3390/nu9040393

ROSENZWAJG, Michelle, Guillaume CHURLAUD, Agnès HARTEMANN and David KLATZMANN, 2014. Interleukin 2 in the Pathogenesis and Therapy of Type 1 Diabetes. *Current Diabetes Reports* [online]. **14**(12), 1–7. ISSN 15390829. Available at: doi:10.1007/s11892-014-0553-6

SAKLAYEN, Mohammad G., 2018. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports* [online]. B.m.: Current Hypertension Reports, **20**(2), 1–8. ISSN 15343111. Available at: doi:10.1007/s11906-018-0812-z

SALHANICK, Arthur I., Seymour I. SCHWARTZ and John M. AMATRUDA, 1991. Insulin Inhibits Apolipoprotein B Secretion in Isolated Human Hepatocytes. **4**, 295–299.

SANZ-FERNANDEZ, M Victoria, et al., 2020. A Cross-Sectional Study of Obesity Effects on the Metabolomic Profile of a Leptin-Resistant Swine Model. 1–7.

SEYFARTH, Julia, et al., 2018. Interleukin-7 receptor α -chain haplotypes differentially affect soluble IL-7 receptor and IL-7 serum concentrations in children with type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes* [online]. **19**(5), 955–962. ISSN 13995448. Available at: doi:10.1111/pedi.12665

SHARMA, Kaustubh, Masudul HAQUE, Richard GUIDRY, Yoichi UETA and Ryoichi TERUYAMA, 2017. Effect of dietary salt intake on epithelial Na⁺ channels (ENaC) in vasopressin magnocellular neurosecretory neurons in the rat supraoptic nucleus. *Journal of Physiology* [online]. **595**(17), 5857–5874. ISSN 14697793. Available at: doi:10.1113/JP274856

SHIM, Kyumin, Rayhana BEGUM, Catherine YANG and Hongbin WANG, 2020. Complement activation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes* [online]. **11**(1), 1–12. ISSN 1948-9358. Available at: doi:10.4239/wjd.v11.i1.1

SCHAUB, Marc A., Alan P. BOYLE, Anshul KUNDAJE, Serafim BATZOGLOU and Michael SNYDER, 2012. Linking disease associations with regulatory information in the human genome. *Genome Research* [online]. **22**(9), 1748–1759. ISSN 10889051. Available at: doi:10.1101/gr.136127.111

SIDDIQUI, Khalid, Salini Scaria JOY and Shaik Sarfaraz NAWAZ, 2019. Impact of Early Life or Intrauterine Factors and Socio-Economic Interaction on Diabetes - An Evidence on Thrifty Hypothesis. *Journal of Lifestyle Medicine* [online]. **9**(2), 92–101. ISSN 2234-8549. Available at: doi:10.15280/jlm.2019.9.2.92

SIFFERT, Winfried, et al., Dongliang YANG, Johannes HÜSING and Dieter ROSSKOPF, 1999. Worldwide ethnic distribution of the G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its association with obesity in caucasian, Chinese, and black African individuals. *Journal of the American Society of Nephrology*. **10**(9), 1921–1930. ISSN 10466673.

SIRACUSA, L. D., A. M. BUCHBERG, N. G. COPELAND and N. A. JENKINS, 1989. Recombinant inbred strain and interspecific backcross analysis of molecular markers flanking the murine agouti coat color locus. *Genetics*. **122**(3), 669–679. ISSN 00166731.

SJÖLANDER, Jonatan, Gunilla T. WESTERMARK, Erik RENSTRÖM and Anna M. BLOM, 2012. Islet amyloid polypeptide triggers limited complement activation and binds complement inhibitor C4b-binding protein, which enhances fibril formation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **287**(14), 10824–10833. ISSN 00219258. Available at: doi:10.1074/jbc.M111.244285

SKOGLUND-ANDERSSON, Camilla, Ewa EHRENBORG, Rachel M. FISHER, Gunilla OLIVECRONA, Anders HAMSTEN and Fredrik KARPE, 2003. Influence of common variants in the CETP, LPL, HL and APO E genes on LDL heterogeneity in healthy, middle-aged men. *Atherosclerosis* [online]. **167**(2), 311–317. ISSN 00219150. Available at: doi:10.1016/S0021-9150(03)00016-9

SPURNÁ, Jaromíra, David KARÁSEK, Veronika KUBÍČKOVÁ, Dominika GOLDMANNOVÁ, Ondřej KRYSŤYNÍK, Jan SCHOVÁNEK and Josef ZADRAŽIL, 2018. Relationship of Selected Adipokines with Markers of Vascular Damage in Patients with Type 2 Diabetes. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* [online]. **16**(5), 246–253. ISSN 15578518. Available at: doi:10.1089/met.2017.0179

STANČÁKOVÁ, Alena and Markku LAAKSO, 2014. Genetics of metabolic syndrome. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* [online]. **15**(4), 243–252. ISSN 15732606. Available at: doi:10.1007/s11154-014-9293-9

SUK, Kyoung-ho, Sunshin KIM, Yun-Hee KIM, Kyoung-Ah KIM, Inik CHANG, Hideo YAGITA, Minho SHONG and Myung-Shik LEE, 2001. IFN- γ /TNF- α Synergism as the Final Effector in Autoimmune Diabetes: A Key Role for STAT1/IFN Regulatory Factor-1 Pathway in Pancreatic β Cell Death. *The Journal of Immunology* [online]. **166**(7), 4481–4489. ISSN 0022-1767. Available at: doi:10.4049/jimmunol.166.7.4481

SULLIVAN, F., 2004. From the Editors: Good, Bad, or Indifferent? *Computing in Science and Engineering* [online]. **6**(6), 3–3. ISSN 1521-9615. Available at: doi:10.1109/mcse.2004.67

SUN, Shumin, Fumiaki HANZAWA, Daeun KIM, Miki UMEKI, Syunsuke NAKAJIMA, Kumiko SAKAI, Saiko IKEDA, Satoshi MOCHIZUKI and Hiroaki ODA, 2019. Circadian rhythm-dependent induction of hepatic lipogenic gene expression in rats fed a high-sucrose diet. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **294**(42), 15206–15217. ISSN 1083351X. Available at: doi:10.1074/jbc.RA119.010328

SURRAKA, Ida and ET AL, 2016. The impact of low-frequency and rare variants on lipid levels A. *Nature Genetics* [online]. **47**(6), 589–597. Available at: doi:10.1038/ng.3300.The

SVART, Mads, Nikolaj RITTIG, Niels MØLLER, Holger J. MØLLER and Henning GRONBAEK, 2019. Soluble CD163 correlates with lipid metabolic adaptations in type 1 diabetes patients during ketoacidosis. *Journal of Diabetes Investigation* [online]. **10**(1), 67–72. ISSN 20401124. Available at: doi:10.1111/jdi.12869

ŠEDA, O., L. ŠEDOVÁ, L. KAZDOVÁ, D. KŘENOVÁ and V. KŘEN, 2002. Metabolic characterization of insulin resistance syndrome feature loci in three brown Norway-derived congenic strains. *Folia Biologica*. **48**(3), 81–8.

ŠEDA, Ondrej, et al., 2008. Systematic, genome-wide, sex-specific linkage of cardiovascular traits in French Canadians. *Hypertension* [online]. **51**(4 PART 2 SUPPL.), 1156–1162. ISSN 0194911X. Available at: doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.105247

ŠEDA, Ondřej, Lucie ŠEDOVÁ, František LIŠKA, Drahomíra KŘENOVÁ, Vratislav PREJZEK, Ludmila KAZDOVÁ, Johanne TREMBLAY, Pavel HAMET and Vladimír KŘEN, 2006. Novel double-congenic strain reveals effects of spontaneously hypertensive rat chromosome 2 on specific lipoprotein subfractions and adiposity. *Physiological Genomics* [online]. ISSN 10948341. Available at: doi:10.1152/physiolgenomics.00039.2006

ŠEDOVIÁ, L., L. KAZDOVIÁ, O. ŠEDA, D. KŘENOVIÁ and V. KŘEN, 2000. Rat inbred PD/Cub strain as a model of dyslipidemia and insulin resistance. *Folia Biologica*. **46**(3), 99–106. ISSN 25337602.

ŠEDOVIÁ, L., F. LIŠKA, D. KŘENOVIÁ, L. KAZDOVIÁ, J. TREMBLAY, M. KRUPKOVIÁ, G. CORBEIL, P. HAMET, V. KŘEN and O. ŠEDA, 2012. CD36-deficient congenic strains show improved glucose tolerance and distinct shifts in metabolic and transcriptomic profiles. *Heredity* [online]. **109**(1), 63–70. ISSN 0018067X. Available at: doi:10.1038/hdy.2012.14

TABASSUM, Rubina, et al., 2019. Genetic architecture of human plasma lipidome and its link to cardiovascular disease. *Nature Communications* [online]. **10**(1). ISSN 20411723. Available at: doi:10.1038/s41467-019-11954-8

TABRIZI, Reza, Maryam AKBARI, Kamran B. LANKARANI, Seyed Taghi HEYDARI, Fariba KOLAHDOOZ and Zatollah ASEMI, 2018. The effects of vitamin D supplementation on endothelial activation among patients with metabolic syndrome and related disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition and Metabolism* [online]. B.m.: Nutrition & Metabolism, **15**(1). ISSN 17437075. Available at: doi:10.1186/s12986-018-0320-9

TWIGGER, Simon N., et al., 2008. What everybody should know about the rat genome and its online resources. *Nature Genetics* [online]. **40**(5), 523–527. ISSN 10614036. Available at: doi:10.1038/ng0508-523

USUI, Shinichi, Yukichi HARA, Seijin HOSAKI and Mitsuyo OKAZAKI, 2002. A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC. *Journal of Lipid Research*. **43**(5), 805–814. ISSN 00222275.

VAN NAS, Atila, Leslie INGRAM-DRAKE, Janet S. SINSHEIMER, Susanna S. WANG, Eric E. SCHADT, Thomas DRAKE and Aldons J. LUSIS, 2010. Expression quantitative trait loci: Replication, tissue- and sex-specificity in mice. *Genetics* [online]. **185**(3), 1059–1068. ISSN 00166731. Available at: doi:10.1534/genetics.110.116087

VETRANI, Claudia, et al., 2020. Diets naturally rich in polyphenols and / or long - chain n - 3 polyunsaturated fatty acids differently affect microbiota composition in high - cardiometabolic - risk individuals. *Acta Diabetologica* [online]. B.m.: Springer Milan, (0123456789). ISSN 1432-5233. Available at: doi:10.1007/s00592-020-01494-9

VLAICU, Sonia I., Alexandru TATOMIR, Dallas BOODHOO, Stefan VESA, Petru A. MIRCEA and Horea RUS, 2016. The role of complement system in adipose tissue-related inflammation. *Immunologic Research* [online]. B.m.: Springer US, **64**(3), 653–664. ISSN 15590755. Available at: doi:10.1007/s12026-015-8783-5

VRÁNA, A., L. KAZDOVIÁ, Z. DOBEŠOVIÁ, J. KUNEŠ, V. KŘEN, V. BÍLÁ, P. ŠTOLBA and I. KLIMEŠ, 1993. Triglyceridemia, Glucoregulation, and Blood Pressure in Various Rat Strains. Effects of Dietary Carbohydrates. *Life Sci II*. **683**, 57–68.

VUČINIĆ, N., K. STANKOV, M. ĐAN, I. BARJAKTAROVIĆ, E. STOKIĆ, L. J. STRAJNIĆ, D. OBREHT and I. ĐAN, 2019. Possible synergistic effect of apoE and LRP1 genotypes on metabolic syndrome development in Serbian patients. *Molecular Biology Reports* [online]. B.m.: Springer Netherlands, **46**(6), 6345–6351. ISSN 15734978. Available at: doi:10.1007/s11033-019-05076-z

WEI, Limin, Meng WEI, Lei CHEN, Shanshan LIANG, Fanfan GAO, Xin CHENG and Hongli JIANG, 2020. Low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio is associated with incident diabetes in Chinese adults: A retrospective cohort study. *Journal of Diabetes Investigation* [online]. 0–2. ISSN 2040-1116. Available at: doi:10.1111/jdi.13316

WEISS, Edward P., Michael D. BROWN, Alan R. SHULDINER and James M. HAGBERG, 2002. Fatty acid binding protein-2 gene variants and insulin resistance: Gene and gene-environment interaction effects. *Physiological genomics* [online]. **10**(3), 145–157. ISSN 1531-2267. Available at: doi:10.1152/physiolgenomics.00070.2001

WEISS, Lauren A., Lin PAN, Mark ABNEY and Carole OBER, 2006. The sex-specific genetic architecture of quantitative traits in humans. *Nature Genetics* [online]. **38**(2), 218–222. ISSN 10614036. Available at: doi:10.1038/ng1726

WHITE, Morris F., 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* [online]. **283**(3 46-3). ISSN 01931849. Available at: doi:10.1152/ajpendo.00514.2001

WOOFF, Yvette, Si Ming MAN, Riemke AGGIO-BRUCE, Riccardo NATOLI and Nilisha FERNANDO, 2019. IL-1 family members mediate cell death, inflammation and angiogenesis in retinal degenerative diseases. *Frontiers in Immunology* [online]. **10**(JULY), 1–21. ISSN 16643224. Available at: doi:10.3389/fimmu.2019.01618

XIE, Fuliang, Peng XIAO, Dongliang CHEN, Lei XU and Baohong ZHANG, 2012. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology* [online]. **80**(1), 75–84. ISSN 01674412. Available at: doi:10.1007/s11103-012-9885-2

YOSHIMI, K., T. KANEKO, B. VOIGT and T. MASHIMO, 2014. Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform. *Nature Communications* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, **5**(May), 1–9. ISSN 20411723. Available at: doi:10.1038/ncomms5240

ZHANG, Yi, et al., 2013. Fatty acid binding protein 3 (fabp3) is associated with insulin, lipids and cardiovascular phenotypes of the metabolic syndrome through epigenetic modifications in a northern european family population. *BMC Medical Genomics* [online]. B.m.: BMC Medical Genomics, **6**(1), 1. ISSN 17558794. Available at: doi:10.1186/1755-8794-6-9

ZHOU, Jun Mei, Ming ZHANG, Shu WANG, Bing Yuan WANG, Cheng Yi HAN and Yong Cheng REN, 2016. Association of the ADIPOQ Rs2241766 and Rs266729 Polymorphisms with Metabolic Syndrome in the Chinese Population: A Meta-analysis. *Biomedical and Environmental Sciences* [online]. **29**(7), 505–515. ISSN 08953988. Available at: doi:10.3967/bes2016.066

ZHOU, Jun Yu, Mi Young SONG and Sunmin PARK, 2019. Carbohydrate and sodium intake and physical activity interact with genetic risk scores of four genetic variants mainly related to lipid metabolism to modulate metabolic syndrome risk in Korean middle-aged adults. *British Journal of Nutrition* [online]. **122**(8), 919–927. ISSN 14752662. Available at: doi:10.1017/S0007114519001752