

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Nutrigenetické a nutrigenomické aspekty
u vybraných patologií.**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Miloslav Hronek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2010

Lucie Krupková

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Nutrigenetické a nutrigenomické aspekty u vybraných patologií.“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a literaturu uvádím v kapitole „Použitá literatura“.

V Havlíčkově Brodě dne 10. 2. 2010

Děkuji panu PharmDr. Miloslavu Hronkovi Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce,
za cenné rady a připomínky.

V Havlíčkově Brodě dne 10. 2. 2010

OBSAH

OBSAH	4
1 Úvod	7
2 Cíl studie	8
3 Nutrigenomika a nutrigenetika obecně	9
3.1 Výživa a lidský genom	9
3.2 Interakce mezi nutrienty a geny	9
3.2.1 Přímá interakce mezi nutrienty a geny – efekt nutrientů na genovou transkripci	9
3.2.2 Epigenetická interakce mezi nutrienty a geny – efekt nutrientů na genovou expresi ..	10
3.2.3 Genetické odlišnosti – vliv na nutriční požadavky	11
3.3 Výživa a ochrana zdraví	13
3.4 Individualizace výživy	13
4 Nutrigenomika, nutrigenetika a obezita	16
4.1 Zlepšení kontroly tělesné hmotnosti použitím genetických informací k individualizaci kontrolované kalorické diety	16
4.1.1 Požadavky na pacienty, analýza jednotlivých skupin a výsledky	17
4.1.2 Redukce tělesné hmotnosti a strava „na míru“	21
4.2 Exprese dvou prozánětlivých genů (RIPK3 a RNF216) v mononukleárních buňkách je spojena se znovunabytím ztracené váhy u obézních subjektů	23
4.2.1 Hodnocení vybraných pacientů	24
4.2.2 Změny antropometrických a klinických parametrů	24
4.2.3 Vliv genů RIPK3 a RNF216 na tělesnou hmotnost	27
5 Nutrigenomika, nutrigenetika a rizikové faktory kardiovaskulárního onemocnění	30
5.1 Genetické interakce s potravou ovlivňují kardiovaskulární choroby	30
5.1.1 Prevence kardiovaskulárních onemocnění podle genotypu jedince	30
5.1.2 Vliv genetického polymorfizmu apolipoproteinu A-I a příjmu polynenasycených mastných kyselin na HDL	31
5.1.3 Polymorfismus genu pro PPAR	32
5.1.4 Rozdílný efekt ω -6 a ω -3 polynenasycených mastných kyselin	33
5.1.5 Rozdílný efekt ω -6 a ω -3 polynenasycených mastných kyselin na 5-lipoxygenázu....	33
5.2 Kombinace mnohočetných genetických rizikových faktorů je spojena s aterosklerózou karotidy	34
5.2.1 Měření IMT a výběr měřených subjektů	35

5.2.2	Statisticky významné kombinace SNP	35
5.2.3	Rizikové faktory aterosklerózy a kombinace SNP	35
5.3	Příjem tuků v potravě a genotyp.....	36
5.3.1	Vliv polymorfizmu v promotorové oblasti genu pro jaterní lipázu na koncentraci HDL	36
5.3.2	Genetické polymorfizmy TNF- α modifikují souvislosti mezi příjmem polynenasycených mastných kyselin a hladinou HDL a apo A-I.....	39
6	Nutrigenomika, nutrigenetika a diabetes mellitus typu 2.....	43
6.1	Geny, strava a diabetes mellitus 2. typu	43
6.1.1	Výskyt diabetu mellitu druhého typu stoupá	43
6.1.2	Diagnóza diabetu a obezity	43
6.1.3	Dědičnost diabetu	44
6.1.4	Skladba výživy u diabetu	44
6.1.5	Kandidátské a vnímavé geny	45
6.1.6	Strava a interakce geny-strava	49
6.1.7	Předcházení komplikacím diabetu pomocí správné stravy	52
6.2	Polymorfizmus <i>SstI</i> genu pro apolipoprotein C-III určuje odpověď inzulinu na oGTT po konzumaci stravy bohaté na nasycené tuky	53
6.2.1	Při stravě bohaté na SFA a v přítomnosti alely <i>S2</i> koncentrace inzulinu po o GTT stoupá	54
7	Nutrigenomika, nutrigenetika a rakovinná onemocnění	56
7.1	Molekulární cíle pro bioaktivní komponenty stravy	56
7.1.1	Strava a spojitost s rakovinou - historie	56
7.1.2	Bioaktivní složky stravy	56
7.2	Karcinogeneze a foláty	57
7.3	Foláty	58
7.4	Kyselina listová – vitamín a všelék nebo genetická časovaná bomba?	60
7.4.1	Foláty – nutriční všelék.....	60
7.4.2	Genetická selekce a příjem folátů v potravě	61
7.5	Přeměna kyseliny 5-formyltetrahydrolistové na 5-methyltetrahydrolistovou je porušena u homozygotů pro <i>C677T</i> v <i>MTHFR</i>	62
7.5.1	Hodnocení aktivity jednotlivých genotypů <i>MTHFR</i>	62
7.6	Polymorfizmus genů účastnících se jednovhlíkového metabolismu a riziko rakoviny prsu ..	64
7.6.1	Metabolismus uhlíku a SNP účastnících se genů.....	64
7.6.2	Interakce genů souvisejících s uhlíkovým metabolismem.....	67
7.6.3	Významná interakce <i>MTHFR</i> a <i>TYMS</i>	67
8	Diskuse	70

9	Závěr	75
10	Souhrn.....	77
11	Abstract.....	78
12	Seznam tabulek	79
13	Seznam obrázků	80
14	Použité zkratky.....	81
15	Použitá literatura	82

1 Úvod

Souhra mezi geny a prostředím, obzvláště stravou, je zásadní pro lidské zdraví. (Ferguson, 2008) Strava představuje multiparametrický přístup k ochraně a/nebo optimalizaci zdraví. Tvoří ji velké množství nutričních a chemických molekul schopných regulovat různorodé biologické procesy. Nutrice vytváří nový komplexní celek, který prosperuje z využívání nových technologií schopných stanovit celou biologickou síť a ne pouze jednotlivé koncové body.

Pole nutrice zahrnuje trvající snahy o pochopení vztahů mezi genomem a stravou v současné době označované jako nutrigenomika a nutrigenetika. Ačkoli jsou tato dvě pojetí úzce spojena, znamenají zásadně odlišný přístup k pochopení vztahů mezi geny a stravou.

Nutrigenomika se snaží určit vliv běžných složek stravy na genom a pokouší se nalézat spojitosti rozdílných fenotypů s odlišnostmi v biologickém systému na úrovni buněčné a genetické odpovědi. V praxi popisuje nutrigenomika použití nástrojů funkční genomiky ke zkoumání biologických systémů, které jsou ovlivněny nutričním podnětem. To pak umožní lepší porozumění, jak nutriční molekuly ovlivňují metabolické cesty a homeostázu. (Mutch, 2005) Nutrigenomika připouští, že dietní doporučení by měla být vytvořena na základě genotypu – co je dobré pro jednoho, nemusí být nezbytně správné pro druhého. Pole nutrigenomiky má tedy obrovský potenciál pro modifikaci lidského zdraví. (Ferguson, 2008)

Nutrigenetika se na druhé straně zaměřuje na pochopení, jak genetická výbava jedince koordinuje odpověď na stravu, a studuje tedy především základní genetické polymorfizmy. Jinými slovy nutrigenetika ztělesňuje obor identifikující a charakterizující varianty genů, které souvisí s rozdílnými odpověďmi na nutrienty, a spojuje tyto varianty se stavem nemoci.

Obě disciplíny objasňují interakce stravy a genomu. Jejich přístup a okamžité cíle jsou ale odlišné. Nutrigenomika se bude zabývat optimální stravou zahrnující série nutričních alternativ, zatímco nutrigenetika přinese zásadně důležité informace, které budou pomáhat klinikům určovat optimální dietu pro dané jedince, tj. individualizovanou stravu. Navzdory odlišným okamžitým cílům vyžaduje dlouhodobý cíl – zlepšit zdraví a předcházet nemocem pomocí vhodné stravy – sloučení obou disciplín. (Mutch, 2005)

2 Cíl studie

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na dva nové obory – nutrigenetiku a nutrigenomiku. Poznatky obou disciplín zahrnují informace o interakci lidských genů a některých složek stravy. Tyto interakce jsou pak hodnoceny v souvislosti s predispozicemi k vybraným chronickým onemocněním.

Cílem mé diplomové práce bylo zdůraznit význam stravy, pomocí níž lze zlepšit zdraví jedince a předcházet nemocem. Je důležité hodnotit genom každého jedince zvlášť, ne se zaměřovat na vytvoření univerzálních doporučení pro všechny. Každý člověk má totiž originální sestavu drobných mutací ve svém genomu a je tedy nutné tomuto faktu přizpůsobovat i stravu a vytvářet tak individualizovaná dietní doporučení.

3 Nutrigenomika a nutrigenetika obecně

3.1 Výživa a lidský genom

Jednotlivé interakce genů a vnějších faktorů tvoří relativně malý příspěvek k celkové buněčné homeostáze, metabolismu a zdravotnímu stavu celého těla. Společně však jejich vliv roste a mohou být příčinou řady polygenetických onemocnění souvisejících s výživou (kardiovaskulární onemocnění, obezita, diabetes mellitus druhého typu, atd.). (Roche, 2006)

3.2 Interakce mezi nutrienty a geny

Příjem potravy a expozice nutrientům jsou klíčovými faktory ovlivňující patogenezi a progresi běžných polygenetických onemocnění souvisejících s příjmem potravy. Interakce mezi lidským genomem a faktory vnějšího prostředí, kterým je člověk vystaven po celý život, pak formují fenotyp každého jedince. Mezi výživou a lidským genomem tedy existuje dynamická obousměrná interakce, která ovlivňuje genovou expresi, metabolickou odpověď a individuální zdravotní stav. (Roche, 2006)

Jednotlivé interakce mezi nutrienty a geny můžeme rozdělit do tří hlavních skupin: 1) přímá interakce: nutrienty se chovají (někdy po interakci s receptorem) jako transkripční faktory, které se mohou vázat na DNA a přímo indukovat genovou expresi; 2) epigenetická interakce: nutrienty mohou ovlivňovat strukturu DNA (nebo strukturu histonů v chromatinu), a tak trvale pozměňovat genovou expresi; a 3) genetické rozdíly: polymorfizmy jednotlivých nukleotidů (single-nucleotide polymorphism; SNP) mohou ovlivňovat expresi nebo funkčnost genů. Všechny tyto mechanismy mohou vyústit v odlišnosti v metabolismu nebo v odlišné dietní požadavky každého jedince. (Zeisel, 2007)

3.2.1 Přímá interakce mezi nutrienty a geny – efekt nutrientů na genovou transkripci

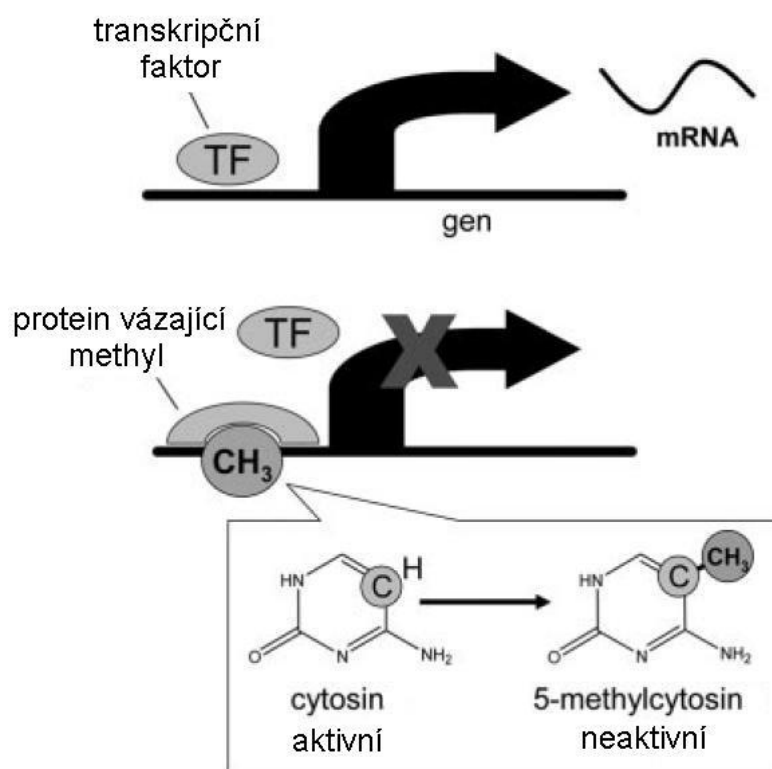
Je známá řada případů, kdy nutrienty působí jako transkripční faktory a modifikují tak genovou expresi. Vitamin A, resp. retinoidy interagují s proteiny receptoru pro

kyselinu retinovou. Tyto komplexy, po navázání na specifická vazebná místa - motivy (např. retinoic acid response elements) v promotorové oblasti genu, aktivují nebo potlačují transkripci. Mastné kyseliny přijaté v potravě mohou interagovat s receptory aktivovanými peroxizomovými proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR), což následně vede k jejich vazbě na DNA a k modifikaci genové exprese. Mezi další příklady interakcí, které modifikují genovou expresi, patří interakce vitamínu D s jeho receptorem, kalcia s kalcineurinem a zinku s transkripčním faktorem 1 reagujícím s kovy (metalresponsive transcription factor 1; MTF 1). Všechny tyto příklady zahrnují nutrienty, které vystupují jako krátkodobé signály v okamžité změně genové transkripce. Takové efekty obvykle odezní, jestliže je expozice nutrientem odstraněna. (Zeisel, 2007)

3.2.2 Epigenetická interakce mezi nutrienty a geny – efekt nutrientů na genovou expresi

Epigenetickými mechanizmy nutrientů, které mají trvalý vliv na genovou expresi, se věda začala zabývat poměrně nedávno. Tyto trvalé efekty jsou zprostředkovány methylací DNA nebo methylací, acetylací či biotinylací histonů, anebo obojí. Takovéto epigenetické modifikace mohou vést ke změnám v genové expresi, které se mohou projevovat po celý život jedince a dokonce se mohou přenášet z generace na generaci. Methylace DNA se obvykle vyskytuje mezi cytosiny, za nimiž následuje guanin (5-CpG-3 ostrůvky), a ovlivňuje genovou transkripci a stabilitu. U savců je 60 – 90 % CpG ostrůvků methylováno. Pokud se tato modifikace nachází v promotorové oblasti genu, dochází k expresi. Vzrůstající počet methylací je obvykle spojen s utlumováním nebo úplnou redukcí genové exprese, protože na methylované CpG ostrůvky se váží capping proteiny a brání tak přístupu transkripčních faktorů, které genovou expresi za normálních okolností zahajují (Obrázek 1). Existuje také několik případů (ne příliš běžných), kdy methylace genů brání navázání inhibičních faktorů, což vede k derepresi genu. Jakmile jsou jednou CpG ostrůvky v genech methylovány, methylace se reprodukuje pokaždé, kdy je gen kopírován. Takto může efekt methylace perzistovat. Změny v dostupnosti methylových skupin v potravě tedy mohou vyvolávat trvalé methylace genů, pozměňovat genovou expresi a následně i fenotyp. (Zeisel, 2007)

Obrázek 1: Methylace DNA může utlumovat genovou expresi. (Ziesel, 2007)



Methylace cytosinu umístěného v seskupení cytosin-guanosin v promotorové oblasti genu (5-CpG-3 ostrůvky) přitahuje capping proteiny, které brání přístupu transkripčních faktorů ke genu, které by za normálních okolností zahájily expresi genu a tvorbu mRNA. Pokud se transkripční faktor nenaváže na promotorovou oblast genu, transkripce mRNA neproběhne a gen je utlumen.

3.2.3 Genetické odlišnosti – vliv na nutriční požadavky

Ačkoli lidé sdílí stejné geny, existuje mnoho individuálních odlišností v sekvencích kodonů pro tyto geny. Celkem rozlišujeme asi 10 miliónů polymorfizmů v jednom nukleotidu (single nucleotide polymorphism; SNP), které se objevují u 1% populace. Některé běžné SNP se objevují dokonce u 5 až 50% populace. Většina lidí má ve svých genech heterozygotní formu pro 50 000 SNP. Jen zlomek těchto SNP vede ke změně genové exprese nebo ke změnám produktů genů, tedy změny ve struktuře nebo funkci proteinů. Mechanizmy, kterými miliony SNP mohou ovlivňovat nutriční požadavky, nejsou zatím přesně známy, ale současné metody zaznamenaly značný pokrok. I když cena genotypingu významně poklesla, malý počet dostupných markerů dělá genotyping všech

markerů nákladný. Proto je třeba vybrat určitou sadu markerů, které by odstranily nezbytnost proměrování všech SNP. V rámci krátkých úseků genů je možné nalézt kombinace sdružených SNP, jež se nacházejí u řady nepříbuzných jedinců (haplotypy). Tyto SNP zůstávají spojeny a jsou děděny přes mnoho generací. Určité vzory spojených SNP v haplotypech charakterizovala mezinárodní vědecká asociace (international scientific consortium). Identifikace několika alel haplotypu jednoznačně určuje ostatní polymorfizmy v rámci skupiny obyvatel podobné rasy a národnosti, čímž se stává SNP analýza praktickou metodou pro odborníky na výživu i pro kliniky. O mnoha relativně běžných SNP je také známo, že ovlivňují nutriční požadavky.

Příkladem může být enzym 5,10-methylenetetrahydrofolátreduktáza (methylenetetrahydrofolate reductase; MTHFR) účastnící se metabolismu folátů. Gen pro MTHFR má běžný SNP (*C677T*), jehož výsledkem je redukce enzymatické aktivity; homozygoti, pokud nepřijímají dostatečně velké množství folátů, mají zvýšenou koncentraci homocysteinu v plazmě. Tento SNP se objevuje u 15 – 30 % populace.

Dalším příkladem může být SNP, který ovlivňuje riziko rozvoje dysfunkce nebo poškození orgánů u lidí, kteří přijímají potravu chudou na cholin. U některých osob se rozvine steatóza jater a poškození jater a svalů, u některých nikoli. Premenopauzální ženy, které jsou nositelkami velmi běžného SNP (*MTHFRD1-G1958A*), měly patnáctkrát vyšší pravděpodobnost než ženy bez tohoto SNP, že se u nich rozvinou známky nedostatku cholinu při nízkocholinové stravě. Riziko narození dítěte s defektem neurální trubice také vzrostlo u žen s tímto SNP. Ženy s nižším příjmem cholinu ve stravě měly čtyřikrát větší riziko narození dítěte s defektem neurální trubice než ženy s příjmem cholinu vyšším. Bylo by zajímavé určit, zda ženy s vysokým rizikem mají *G1985* SNP v genu *MTHFD1*.

Gen pro fosfatidylethanolamin-*N*-methyltransferázu (phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase; PEMT) kóduje tento protein odpovědný za endogenní tvorbu cholinu v játrech a je indukován estrogenem. Ve studiích orgánové dysfunkce ve vztahu k nedostatku cholinu u lidí se zjistilo, že SNP v oblasti promotoru genu *PEMT* (*rs12325817*) byl spojen s větší náchylností k nedostatku cholinu u žen, ale ne u mužů.

Všechny z výše zmíněných příkladů genetických variací ovlivňující nutriční požadavky se účastní jedno-uhlíkového metabolismu, byly však identifikovány i SNP ovlivňující další metabolické cesty. Příkladem může být SNP v genu pro protein vázající mRNA serpinu 1 (serpine1 mRNA binding protein 1; SERBP) ovlivňující jaterní

lipogenezi indukovanou fruktózou. Gen pro PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) má SNP, který hraje roli v úpravě koncentrací celkového cholesterolu, lipoproteinu o nízké hustotě (low-density lipoprotein; LDL) a apolipoproteinu B a pozměňuje odpověď na nutriční příjem ω -6 polynenasycených mastných kyselin. U lidí s touto alelou byl zvýšený příjem ω -6 polynenasycených mastných kyselin spojen se značnou redukcí koncentrace triacylglycerolu.

Databáze funkčně důležitých SNP by umožnila nutričním specialistům používat SNP profilování k tomu, aby vytvářeli praktická doporučení jako součást klinické praxe (např. doporučit zvýšený příjem cholinu během těhotenství u žen se SNP, který ovlivňuje expresi genu *PEMT*). (Ziesel, 2007)

3.3 Výživa a ochrana zdraví

Výživa hraje důležitou roli v ochraně zdraví a zpomalování progresu onemocnění. K tomu, aby stoupl věk počátku rozvoje chronických degenerativních onemocnění a aby byli lidé co možná nejdéle zdraví, je potřeba nových přístupů, které prosazují výživové komponenty „zdravého stárnutí“. Cílem je, pokud možno, snížit morbiditu.

Na důkazech založený, na prevenci orientovaný, v populaci rozšířený celoživotní přístup k ochraně zdraví zahrnuje strategie jak pro běžnou populaci, tak pro lidi s vysokým rizikem onemocnění. Tento preventivní přístup identifikuje ty, kteří mají markery pravděpodobnosti výskytu určitého onemocnění, ale ještě se u nich toto onemocnění neprojeví, a zaměřuje se především na prevenci. Úrovně, na kterých mohou být provedena vhodná opatření, jsou následující: udržování co největšího množství lidí mimo riziko (primární prevence), udržování rizikových lidí v co nejmenším možném riziku a oddálení propuknutí onemocnění (sekundární prevence), a u lidí, kteří již onemocněli, léčení a snižování progresu onemocnění (terciární prevence). (Dwyer, 2006)

3.4 Individualizace výživy

Naše závislost na jídle kvůli přežití je evidentní. Kromě toho již dlouho známe i schopnost stravy přispívat ke zdraví. Navzdory tomuto faktu je prevalence onemocnění souvisejících se stravou (např. obezity, diabetu mellitu 2. typu, kardiovaskulárních

onemocnění) v západních zemích stále na vzestupu. Primární vliv na počátek těchto onemocnění pramení ze změn v našem životním stylu, tj. vysoký příjem stravy společně s nízkou fyzickou aktivitou. Ale i přesto, že známe jasné vzájemné vztahy mezi stavem onemocnění a nutricí, přesné mechanismy, kterými změny v životním stylu ovlivňují zdraví, zůstávají neobjasněny. Tato záhada je doložena velice běžnými případy dvou jedinců, kdy oba mají stejnou úroveň fyzické aktivity, jedí stejnou stravu, ale jen jeden zvýší svoji hmotnost.

Ačkoli nutriční doporučení ke zlepšení zdraví a snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny, hypertenze, diabetu mellitu druhého typu a obezity jsou běžně používána, jsou založena na charakteru celé populace, nikoli na jedinci samotném. Výrazně odlišné odpovědi mezi jedinci na přijatou potravu ukazují, že naše dosavadní chápání mechanismů těchto rozdílů je daleko od skutečnosti. Proto se začal rozvíjet velmi intenzivní zájem o pochopení biologických mechanismů, které jsou spouštěny vnějšími podmínkami. Ačkoli je zřejmé, že kouření, fyzická aktivita a toxiny jsou schopné ovlivňovat zdraví, je to především naše soustavná celoživotní expozice potravinám, která činí stravu nejdůležitějším vnějším faktorem působícím na náš biologický systém.

Pozorovatelné rozdíly v odpovědi jedince na stravu jsou přisuzovány odlišnostem ve stavbě základní genetické informace. Tento poznatek podněcuje prozkoumání role interakcí genů a nutrientů a určení zdravého fenotypu. Přístup k takovému výzkumu je usnadněn nedávným vstupem do post-genomické éry, což bylo potvrzeno rozvojem analytických metod a shromážděním doplňujících dat. Na základě těchto dat se vytvářejí algoritmy, pomocí nichž lze kompletně studovat a interpretovat biologický systém.

Na rozdíl od farmaceutického průmyslu, jehož cílem je zlepšovat zdraví zacílením na dysfunkční geny či genové produkty, zaměřují se nutriční snahy na komplexní směs nutričních molekul (tj. stravu) a na to, jak každá jednotlivá složka ovlivňuje biologický systém. Tudíž, v porovnání s léčivy, výživa drasticky zvýšila počet molekulárních cílů, které jsou schopné ovlivňovat fenotyp, a proto se umístila oblast nutrigenomiky a nutrigenetiky na přední pozici a začala hojně využívat technologické inovace postgenomické éry. Vzor farmaceutického průmyslu, že jedna molekula léčiva má v organismu jeden cíl, je pro tuto novou oblast záměr nevhodný. Z tohoto důvodu byl nástup nutrigenomiky a nutrigenetiky zásadní.

Jedná se o dva přístupy s odlišnými cíly řešícími vztahy mezi výživou a geny, ale se společným hlavním úkolem - optimalizovat zdravotní stav. Ačkoli oba tyto přístupy objasňují nutri-genetické interakce odděleně, je naprosto nezbytné pracovat s nimi společně. Jen tak lze dosáhnout požadovaného cíle – individualizace výživy. Kromě toho, genetická výbava člověka je tak rozmanitá, že odlišit tyto dva přístupy je prakticky nemožné. Proto by měly spadat pod obecnější označení „nutriční genomika“. (*Mutch, 2005*)

4 Nutrigenomika, nutrigenetika a obezita

4.1 Zlepšení kontroly tělesné hmotnosti použitím genetických informací k individualizaci kontrolované kalorické diety

Je řádně zdokumentováno, že počet osob s nadváhou a obezích na celém světě neustále roste a dosahuje epidemických rozměrů. Tento jev spolu nese zdravotní, sociální a ekonomické následky. I když bylo zvažováno mnoho příčin této epidemie, nejpravděpodobnější zůstanou vysoký kalorický příjem a nízká pohybová aktivita, typické pro moderní životní styl. S největší pravděpodobností lidé, kteří více jedí a méně cvičí, zvýší svoji tělesnou hmotnost. Ale dosažení stádia nadváhy nebo obezity je postupný proces, který probíhá mnoho let, během nichž osoba přijímá pouze nepatrný nadbytek energie. Např. v USA lidé přiberou průměrně 15 kilogramů tělesné hmotnosti mezi 25-ti a 55-ti lety. Tato úroveň přibírání tělesné hmotnosti představuje pouze 0,5 kg za rok, což znamená pouze několik nadbytečných kalorií za den.

Režimová opatření mohou vyústit v úbytek tělesné hmotnosti dostačující ke zlepšení zdraví u mnoha pacientů, ale za čas se většinou tělesná hmotnost znovu získá zpět. Ačkoli pro mnoho lidí je redukce hmotnosti obtížným cílem, její udržení je mnohdy ještě těžší. Ve skutečnosti jen velmi málo nechirurgických léčebných opatření v rámci obezity vede k udržení hmotnostního úbytku. Dlouhodobé udržení váhy vyžaduje trvalé změny životního stylu – zvýšení pohybové aktivity a změnu stravovacích návyků. Je třeba, aby tyto změny byly významné, ale ne nezbytně radikální nebo nedosažitelné, protože se jedná o plánování postupného, ale trvalého úbytku hmotnosti během několika let. NIH (The National Institutes of Health) doporučil desetiprocentní úbytek hmotnosti jako cíl pro prvních šest měsíců (tzn. 0,25 – 0,5 kg za týden) následovaný udržováním hmotnosti nebo dalším snižováním hmotnosti (pokud je to vyžadováno), ale v menší míře.

Již dlouho je známo, že neexistuje jedna univerzální redukční dieta pro všechny. Tento fakt byl dokázán během nedávných let ve studiích zabývajících se interakcemi genů a stravy a vznikem nutrigenetiky. Cílem nutrigenetiky je doplnit k předepisované dietě i určitý individuální podíl upravený podle genetických odlišností každého jedince. Nutrigenetické metody v klinické praxi analyzují především geny účastníci se metabolismu a transportu nutrientů, odstraňování toxinů a ochrany před oxidací. Podle konkrétních

vzorů genetických odlišností každého jedince mohou být vytvořena individuální doporučení na stravu a úpravu životního stylu tak, aby se dosáhlo geneticky podmíněného specifického cíle ve výživě a fyzické aktivitě.

Nutrigenetická dieta použitá v této studii nebyla navržena pacientům jako redukční dieta; účelem bylo optimalizovat obsah nutrientů v denním příjmu stravy jednotlivce a to na podkladě individuálního genetického profilu. Pokud jednatelce snižuje tělesnou hmotnost pomocí běžných redukčních diet, množství potravy je redukováno a jednotlivé nutrienty nedosahují adekvátní dávky. Nutrigenetika může být tedy nástrojem, který pomůže docílit optimálního obsahu nutrientů na individuální bázi. Kromě toho, použití nutrigenetiky při vytváření individuálních dietních programů vede ke zvýšení motivace a compliance během dlouhodobých změn v životním stylu.

4.1.1 Požadavky na pacienty, analýza jednotlivých skupin a výsledky

Pacientům s historií neúspěšného snižování tělesné hmotnosti byl nabídnut nutrigenetický screening 24 genetických variant v 19 genech souvisejících s metabolismem. 50 pacientů utvořilo nutrigenetickou skupinu a dále bylo vybráno 43 pacientů navštěvujících stejnou kliniku jako kontrolní skupina. Tito pacienti byli spárováni podle určitých charakteristik: věk, pohlaví, počet návštěv na klinice a váhově-výškový index (body mass index; BMI) při úvodní návštěvě. Skupina 43 pacientů nepodstoupila nutrigenetický test.

Postup studie spočíval v periodické analýze záznamů pacientů, které byly anonymní, a bylo jim přiřazeno identifikační číslo. Klinici, kteří léčili pacienty, nevěděli, kteří z nich jsou zahrnuti do studie.

.4.1.1.1 Strava a cvičení

Všichni pacienti dodržovali tradiční dietní program obsahující středomořskou stravu s nízkým glykemickým indexem, doporučené pravidelné cvičení a návštěvy na klinice. Dietní program pacientů v nutrigenetické skupině byl modifikován podle genetických výsledků každého jedince (viz Tabulka 2). Až na modifikaci standardní diety a cvičebního programu byli pacienti léčeni stejným způsobem.

.4.1.1.2 Laboratorní měření

V pravidelných intervalech byly analyzovány hodnoty BMI a výsledky krevních testů podle záznamů pacientů na klinice. Vzorek venózní krve byl odebírán ráno po nočním lačnění. Pomocí enzymatického kitu se určila hladina glukózy nalačno. Dále se měřila hladina celkového cholesterolu v séru a hladina lipoproteinu o vysoké hustotě (high-density lipoprotein; HDL) pomocí enzymatických metod. Pro nutrigenetické testování byl použit speciální kit. Dále byly analyzovány vzorky bukových buněk a pacienti vyplňovali dotazník o stravě a životním stylu. Celkem bylo testováno 19 variant genů (viz Tabulka 1).

.4.1.1.3 Výsledky studovaných skupin

Během prvních 180 dní terapie byly výsledky obou skupin testovaných jedinců velmi podobné. Ukázal se srovnatelný průměrný úbytek hmotnosti asi na 90 % původní hmotnosti (92,9 % u nutrigenetické skupiny a 88,9 % u skupiny srovnávací). Nutrigeneticky testovaná skupina měla tendenci k lepší redukci BMI, ale v období 100 – 300 dní se neprojevovaly významnější rozdíly.

Po 300 dnech se však u jedinců z testované skupiny (73 %) objevil mnohem znatelnější úbytek hmotnosti než u jedinců ze skupiny kontrolní (32 %). Průměrná redukce BMI pak činila 1,93 kg/m² (pokles o 5,6 %) u nutrigenetické skupiny a 0,86 kg/m² (pokles o 2,2 %) u skupiny kontrolní ($p < 0,023$). Zlepšila se i hladina glukózy v krvi nalačno: u testované skupiny klesla průměrně o 57 % původní hodnoty, u kontrolní pouze o 25 %.

Tabulka 1: Geny a polymorfizmy testované v nutrigenetické skupině pacientů. (Arkadianos, 2007)

Gen pro:	Symbol	Poly-morfizmus	Nemutovaní homozygoti (wild type)	Heterozygoti	Homozygoti	HWE p <
Angiotensin I konvertující enzym	<i>ACE</i>	INS/DEL	14,6%	48,8%	36,6%	0,99
Apolipoprotein C-III	<i>APOC3</i>	3175C>G	73,3%	20,0%	6,7%	0,17
Cystathionin-beta-syntáza	<i>CBS</i>	699C>T	53,5%	41,9%	4,7%	0,81
Cholesterylester transfer protein	<i>CETP</i>	279G>A	48,8%	39,5%	11,6%	0,86
Kolagen, typ I, alfa 1	<i>COL1A1</i>	G Sp1 T	58,1%	34,9%	7,0%	0,94
Glutathion S-transferáza M1	<i>GSTM1</i>	delece (*)	52,0%	0,0%	48,0%	N/A
Glutathion S-transferáza pí	<i>GSTP1</i>	313A>G 341C>T	57,8% 56,8%	33,3% 34,1%	8,9% 9,1%	0,68 1,00
Glutathion S-transferáza théta 1	<i>GSTT1</i>	delece (*)	86,0%	0,0%	14,0%	N/A
Interleukin 6	<i>IL6</i>	-174G>C -634G>C	66,7% 86,0%	33,3% 14,0%	0,0% 0,0%	0,37 0,89
Lipoproteinová lipáza	<i>LPL</i>	1595C>G	69,8%	27,9%	2,3%	1,00
5-methyltetrahydrofolát-homocystein-methyltransferáza reduktáza	<i>MTRR</i>	66A>G	19,0%	45,2%	35,7%	0,90
5,10-methyltetrahydrofolát reduktáza	<i>MTHFR</i>	1298A>C 677 C>T	34,0% 48,0%	48,9% 44,0%	17,0% 8,0%	1,00 0,95
5-methyltetrahydrofolát-homocystein methyltransferáza	<i>MTR</i>	2756A>G	59,5%	33,3%	7,1%	0,86
Endoteliální NO syntáza 3	<i>NOS3</i>	894G>T	44,2%	44,2%	11,6%	1,00
Peroxisomálním poliferátorem aktivovaný receptor gama	<i>PPARG</i>	Pro12Ala	75,6%	15,6%	8,9%	0,02
Mitochondriální superoxid-dismutáza 2	<i>SOD2</i>	-28C>T	10,0%	54,0%	36,0%	0,57
Extracelulární superoxide-dismutáza 3	<i>SOD3</i>	760C>G	100,0%	0,0%	0,0%	1,00
Tumor nekrotizující factor α	<i>TNFα</i>	-308G>A	71,1%	24,4%	4,4%	0,72
Vitamin D receptor	<i>VDR</i>	C Taq1 T T Bsm1 C T Fok1 C	23,3% 23,3% 11,6%	46,5% 46,5% 58,1%	30,2% 30,2% 30,2%	0,91 0,91 0,41

Četnost genotypů ve studovaných skupinách a p-hodnoty pro Hardy-Weinbergův princip (Hardy Wienberg Equilibrium; HWE).

(*) rozbor pouze určil přítomnost nebo nepřítomnost polymorfizmu, proto HWE test není použitelný.

Tabulka 2: Individualizovaná doporučení pro skupinu nutrigeneticky testovaných pacientů mimo základní diety. (Arkadianos, 2007)

Intervenční skupina:	% pacientů, kteří obdrželi upravené doporučení
Polymorfismus v <i>MTHFR</i>, <i>MTRR</i>, <i>MTR</i> nebo <i>CBS</i>:	98,6
<i>Popis:</i> Polymorfismus v těchto genech ovlivňuje metabolismus kyseliny listové a touto cestou ovlivňuje i hladinu homocysteinu v plazmě a také rovnováhu mezi methylací DNA a syntézou nukleotidů.	
<i>Doporučení:</i> Přidat doplněk stravy obsahující 800 µg kyseliny listové, 15 mg vitamínu B ₆ a 20 µg B ₁₂ .	
Polymorfismus v <i>GSTM1</i>, <i>GSTT1</i> nebo <i>GSTP1</i>:	76,1
<i>Popis:</i> U pacientů s delecemi v <i>GSTM1</i> , které ovlivňují fázi II detoxikačního procesu, bylo prokázáno, že když zkonsumují adekvátní množství zeleniny z čeledi brukvovitých, snižují tyto delece hladinu DNA aduktů a zvyšují úroveň aktivity cirkulující GSTA1. Pokud je u jednotlivců s delecí genů <i>GSTM1</i> a/nebo <i>GSTT1</i> konzumace brukvovité zeleniny vysoká, klesá riziko rakoviny plic až o 80%.	
<i>Doporučení:</i> Zajistit dietu obsahující pravidelný přísun zeleniny z čeledi brukvovitých (5krát týdně) a česnekovitých (denně). Pokud je to nutné, lze přidat i brokolicevý či česnekový extrakt.	
Polymorfismus v <i>SOD2</i>, <i>SOD3</i>, <i>NOS3</i>:	48,6
<i>Popis:</i> Superoxiddismutázy jsou vychytávači volných radikálů a mají tak antioxidační aktivitu, která může být ovlivněna genetickým polymorfismem.	
<i>Doporučení:</i> Přidat doplňky obsahující antioxidanty - vitamin A (5,000 IU), vitamin C (250 mg) a vitamin E (200 IU).	
Polymorfismus v <i>VDR</i>, <i>COL1A1</i>:	87,5
<i>Popis:</i> Několik studií prokázalo, že interakce genů a stravy hraje roli v udržení dobrého stavu kostí. Např. kofein zvyšuje ztrátu kostní hmoty, ale jen v přítomnosti polymorfismu <i>VDR taq1</i> . Další varianty tohoto genu prokazují interakci genů a stravy vyžadující zvýšený přísun kalcia a vitamínu D.	
<i>Doporučení:</i> Nepít více než 2 šálky kávy denně. Zvýšit přísun mléčných výrobků (jogurty, sýry, nízkotučné mléko). Pokud je třeba, lze přidat jako doplněk stravy 800 IU vitamínu D a 1300 mg kalcia.	
Polymorfismus v <i>TNFα</i>, <i>IL6</i>, <i>NOS3</i>:	65,3
<i>Popis:</i> Variace v prozánětlivých genech <i>TNFα</i> a <i>IL6</i> ovlivňují zánětlivé procesy a jejich vliv může být modulován konzumací rybího tuku.	
<i>Doporučení:</i> Přidat omega 3 mastné kyseliny (700 – 1400 mg). Zajistit týdenní příjem rybího tuku.	
Polymorfismus v <i>CETP</i>, <i>LPL</i>, <i>APOC3</i>:	79,2
<i>Popis:</i> Polymorfismus v těchto genech ovlivňuje metabolismus a transport lipidů; v kombinaci s příjmem tuků ve stravě byl prokázán efekt na plazmatické koncentrace cholesterolu.	
<i>Doporučení:</i> Základní nízkotučná strava je již s patřičnými limity doporučenými pro tyto varianty, proto už další specifické rady nejsou třeba. Předchozí rady se pouze zdůrazní a doporučí se snížit příjem mléčných výrobků.	
Polymorfismus v <i>ACE</i>, <i>PPARG</i>:	80,6
<i>Popis:</i> V souvislosti s tímto polymorfismem interakce genů a stravy a genů a fyzické aktivity ovlivňují hladinu glukózy v krvi a hladinu inzulínu.	
<i>Doporučení:</i> Základní nízkoglykemická dieta je již s patřičnými limity doporučenými pro tyto varianty, proto už další specifické rady nejsou třeba. Předchozí doporučení se pouze zdůrazní. Dále je doporučeno speciální cvičení pro tuto skupinu.	

4.1.2 Redukce tělesné hmotnosti a strava „na míru“

Výsledkem nutrigenetické individuálně přizpůsobené diety byla lepší dlouhodobá redukce BMI a lepší hladina glukózy v krvi nalačno. Zajímavé je, že snižování hmotnosti obou skupin během několika prvních měsíců bylo prakticky stejné. Avšak po jednom roce u kontrolní skupiny došlo v průměru k mírnému přírůstku tělesné hmotnosti, zatímco u nutrigenetické testované skupiny pokračoval úbytek hmotnosti, i když v menší míře než v prvních 90 dnech. To svědčí o lepší compliance k redukčním programům u testované nutrigenetické skupiny, která dosáhla dlouhodobých změn v životním stylu, což vedlo k udržení hmotnostního úbytku a zlepšení hladiny glukózy v krvi. Většina subjektů s porušenou glukózovou tolerancí dosáhla opět normální hladiny glukózy v krvi, což představuje významný zdravotní benefit. V této studii bylo zaznamenáno, že počet prediabetických subjektů v nutrigenetické skupině ($n = 30$) byl výrazně větší než v kontrolní skupině ($n = 16$). U těchto jedinců v nutrigenetické skupině bylo detekováno zlepšení hladiny glukózy jako statisticky významné, u jedinců z kontrolní skupiny nikoli. Celkově byl však pokles hladiny glukózy v nutrigenetické skupině o více než 20% větší než ve skupině kontrolní (12,3 mg/dl vs. 10,1 mg/dl). V nutrigeneticky testované skupině byl dále pokles tělesné hmotnosti po jednom roce mírný a ustálený. Takovýto malý úbytek hmotnosti spojený se zdravějším stravováním a životním stylem může vést k významné redukci rizika chorob spojených s nadváhou jako je diabetes, kardiovaskulární choroby a metabolický syndrom.

Nutrigenetické testy použité v této studii přesně určují genetické odlišnosti v 19 genech v 7 nutričních intervenčních skupinách. Tento test nebyl specificky vyvinut jako nástroj pro sledování hmotnosti, ale jako prostředek pro optimalizaci a poskytnutí individualizované podpory zdravých stravovacích návyků.

Jednotlivé skupiny polymorfizmů byly vybrány podle dokumentované evidence interakcí mezi geny a stravou, kde změny ve stravování nebo v pohybové aktivitě modifikují efekt těchto polymorfizmů. Všem pacientům v nutrigeneticky testované skupině byla předepsána dietní úprava alespoň v jedné hlavní nutriční intervenční skupině a dále obdrželi specifická doporučení ještě ve čtyřech či více dalších skupinách (viz Tabulka 2). Celkově byla v nutrigeneticky testované skupině značná rozmanitost v souborech doporučení pro jednotlivé pacienty.

Rozdíly v dlouhodobých výsledcích mezi oběma sledovanými skupinami podmiňují fakt, že použití nutrigenetiky ve smyslu individualizace výživy by mohlo být novým užitečným nástrojem pro dosažení úbytku a následné udržení tělesné hmotnosti. Udržení úbytku tělesné hmotnosti je obzvláště významné u těch pacientů, kteří vyhledali odbornou pomoc po předchozím neúspěšném pokusu o snížení tělesné hmotnosti bez odborného zásahu.

Zahrnutí genetických, individualizovaných složek do redukčního programu zlepšilo motivaci a compliance pacientů, ale je také zřejmé, že individualizovaná strava je vhodnější proto, že optimalizuje obsah makro- a mikronutrientů pro jednotlivce během období, kdy je celkový příjem potravy snížen a výdej energie zvýšen.

V této studii je však i několik omezení. Data by mohla být ovlivněna odlišností v úrovni compliance mezi skupinami. Vzhledem k tomu, že v této studii není žádná placebo skupina, není možné posoudit fyziologické zlepšení díky specifickému nutričnímu doporučení cílenému na genotyp pacienta. Další limitací je, že do studie jsou zahrnuti pouze běloši z Řecka, kteří měli problémy s předchozím snižováním tělesné hmotnosti. Proto nemusí být výsledky bezpodmínečně reprezentativní pro jiné skupiny a ani pro osoby jiného etnického či kulturního původu nebo s jinými klinickými charakteristikami.

A konečně i velikost vzorku, obzvláště pro porovnání změn hladin glukózy, nebyla dostatečně velká. I když v testované skupině byl efekt velikosti vzorku větší než v kontrolní skupině (směrodatná odchylka 0,81 vs. 0,66) a významně vyšší procento nutrigeneticky testovaných než netestovaných snížilo hladinu glukózy pod 100 mg/dl. Tudíž menší velikost vzorku v netestované skupině sama o sobě nevysvětluje rozdíl mezi skupinou testovanou a netestovanou.

Pacientům v této studii byla předložena základní dieta, která se skládala z vyvážené stravy s nízkým glykemickým indexem a byla upravena podle potřeb testovaných pacientů. Existuje přemíra různých typů nízkokalorických diet dostupných pro pacienty, kteří chtějí zhubnout. Takové diety obsahují velmi rozdílné úrovně různých makronutrientů. Ačkoli nutrigenetika není ještě takovým nástrojem, aby určovala, který typ diety povede k největšímu hmotnostnímu úbytku pro určitého jednotlivce, je to oblast aktivního výzkumu. Data z této studie ukazují, že použití nutrigenetiky ke zlepšení a optimalizaci zdravé, vyvážené stravy v klinické praxi by mohlo efektivně pomoci v dlouhodobých

změnách v životním stylu, které by vedly k udržení hmotnostního úbytku. (Arkadianos, 2007)

4.2 Exprese dvou prozánětlivých genů (RIPK3 a RNF216) v mononukleárních buňkách je spojena se znovunabytím ztracené váhy u obézních subjektů

Obezita je multifaktoriální onemocnění vedoucí k řadě chorob, jejichž prevalence celosvětově vzrůstá. Současné redukční metody jsou většinou založeny na změnách stravování a zvýšení fyzické aktivity, což ovšem často přináší jen krátkodobé výsledky. Ve skutečnosti, váhové výkyvy a relapsy jsou běžnými prvky po léčbě obezity redukčními metodami. Selhání v udržení váhového úbytku by mohlo být částečně vysvětleno genetickými faktory nebo interakcí mezi geny a prostředím.

V posledních letech je využíváno inovativních výzkumných strategií k pochopení molekulárních mechanismů uplatňujících se v ukládání tukové hmoty a v regulacích snižujících váhu. V tomto smyslu se na poli nutrigenomiky studují vztahy mezi výživou a odpovědí genů na molekulární úrovni a zkoumá se tak odpověď na nutriční terapii obezity a metody kontrolování hmotnosti. Tato oblast molekulární nutrigenomiky vlastně poskytuje biomarkery poukazující na rizikové faktory onemocnění spojených s výživou jako je na příklad již zmíněná obezita.

Aby bylo možné identifikovat nutrigenomické cíle spojené s obezitou a perzonifikovat dietní léčbu, byly porovnány změny v genové expresi před aplikací nízkokalorické diety a po ní. Tento výzkum ukázal down-regulaci v genech souvisejících s TNF α /NF κ B signální dráhou po dietní terapii obezity, což dává do souvislosti obezitu se zánětlivým procesem. Pro následný výzkum byly vybrány geny pro serin-threonin kinázu 3 interagující s receptorem (receptor-interacting serinethreonine kinase 3; RIPK3; GeneID: 11035) a RNF216 (ring finger protein 216, GeneID: 54476). Oba tyto geny totiž vykazují nejsilnější pokles na úrovni mRNA v periferních krevních mononukleárních buňkách (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) po léčbě redukční dietou.

RIPK3 patří do rodiny proteinů interagujících s receptorem a účastní se aktivace transkripčního faktoru NF κ B (nuclear factor κ B), zatímco gen RNF216 kóduje cytoplasmatický protein, který specificky interaguje s RIPK3. Takže oba geny jsou

součástí signálního komplexu receptoru-I pro tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor; TNF) a společně se účastní aktivace NFκB, který hraje významnou roli v zánětlivém procesu, autoimunitní odpovědi, při buněčném dělení a apoptóze a nejspíš se podílí i na kontrole tělesné hmotnosti.

Většina studií zkoumajících genovou expresi u lidské obezity je zaměřena na vzorky tukové tkáně. Avšak nutrigenomické studie jasně upozorňují na nedostatek dat, protože je obtížné získávat bioptické vzorky od každého dobrovolníka ze studie kvůli invazivní metodě získávání vzorků. Tudíž lidská krev je nejsnáze dostupným zdrojem RNA pro zkoumání znaků genové exprese ve vztahu k individualizované léčbě obezity.

Vlivu cyklování hmotnosti na profil genové exprese v periferních mononukleárních buňkách nebyla zatím také věnována dostatečná pozornost. Proto by analýza transkriptomu genů v periferních mononukleárních buňkách mohla být slibným přístupem k individualizované léčbě obezity. Cílem této studie bylo tedy analyzovat změny v genové expresi genů RIPK3 a RNF216 v periferních mononukleárních buňkách u obézních pacientů, kteří podstoupili nízkokalorickou dietu (low-calorie diet; LCD) a během následujících šesti měsíců byla sledována jejich tělesná hmotnost s důrazem na přepokládaný individualizovaný nutrigenomický přístup.

4.2.1 Hodnocení vybraných pacientů

Z 84 obézních subjektů bylo vybráno 6 mužů a 6 žen a byly rozděleny podle znovuzískání hmotnostního úbytku po šesti měsících po absolvování osmiměsíční LCD na dvě skupiny (BMI $32,3 \pm 5,5$ kg/m³, věk $37,7 \pm 7,1$ let). Úroveň mRNA genů RIPK3 a RNF216 v PBMC byla hodnocena pomocí qRT-PCR ve třech časových intervalech (týden 0, 8, 32).

4.2.2 Změny antropometrických a klinických parametrů

Nízkokalorická léčba byla spojena s redukcí tělesné hmotnosti a současně i se zaznamenaným poklesem tukové hmoty u všech dobrovolníků (viz Tabulka 3). Tento zeštíhlující proces byl doprovázen i poklesem celkového cholesterolu v plazmě a poklesem systolického krevního tlaku, avšak hladina triglyceridů, glukózy a inzulínu se prakticky

nezměnila a nedošlo ani k poklesu diastolického tlaku krve, ani inzulinové rezistence (Homeostatic model assessment for insulin resistance; HOMA-IR).

Tabulka 3: Změny v antropometrických a klinických parametrech u vybraných subjektů (n = 12), které podstoupily nízkokalorickou dietu, aby snížily svoji tělesnou hmotnost. (Goyenechea, 2009)

Parametr	Měřené hodnoty (n = 12)		
	Na začátku	Po 8 týdnech	p-hodnoty
Tělesná hmotnost (kg)	89,3 (73,2–105,4)	83,1 (69,3–96,9)	<0,001
BMI (kg/m ²)	31,5 (27,6–35,4)	30,5 (28,3–32,7)	<0,001
Tuková hmota (%)	34,9 (20,8–49,0)	32,1 (19,9–44,3)	<0,001
Glukóza (mmol/l)	5,1 (4,3–5,9)	5,0 (4,7–5,3)	0,753
Inzulín (U/ml)	9,8 (7,5–12,1)	9,5 (8,3–10,7)	0,158
HOMA-IR	2,0 (0,9–3,1)	1,9 (0,7–2,1)	0,192
Systolický krevní tlak (mm Hg)	125 (109–141)	110 (90–130)	0,017
Diastolický krevní tlak (mm Hg)	71 (60–82)	69 (57–81)	0,184
Cholesterol (mmol/l)	5,2 (4,0–6,4)	4,9 (3,3–6,5)	0,010
Triglyceridy (mmol/l)	1,07 (0,44–1,70)	1,03 (0,46–1,60)	0,954

Data jsou vyjádřena jako medián a interkvartilové rozpětí (IQR), p-hodnota je získána Wilcoxonovým testem pro sloučené páry.

HOMA-IR = Homeostatic model assessment for insulin resistance – homeostatický model inzulinové rezistence.

Subjekty byly dále rozděleny podle znovuzískání předchozího váhového úbytku do dvou skupin; 6 subjektů přibralo o více než 10% původního úbytku (WRS = weight-regain subjects; subjekty, které zvýšily hmotnost) a 6 subjektů získalo méně než 10% původního hmotnostního úbytku (WMS = weight-maintenance subjects; subjekty, které si hmotnost udržely). Tyto skupiny byly spárovány dle daných kritérií (BMI, pohlaví, věk). Znovunabytí ztracené váhy je přisuzováno opětovnému vzrůstu tukové hmoty (viz Tabulka 4).

Tabulka 4: Fenotypické charakteristiky před aplikací nutriční léčby (týden 0) a po ní (týden 8) a o 6 měsíců později (týden 32). (Goynechea, 2009)

	WRS (n = 6)	WMS (n = 6)	p-hodnota
Tělesná hmotnost (kg)			
Den 0	89,3 (74,3–104,3)	89,1 (76,8–101,0)	0,737
Den 56	83,8 (70,7–96,6)	82,9 (71,3–94,5)	0,738
Týden 32	86,5 (70,8–102,2)	80,0 (67,3–92,7)	0,013
BMI (kg/m²)			
Den 0	31,5 (28,3–34,7)	31,2 (28,3–34,1)	0,523
Den 56	30,9 (28,1–33,7)	30,3 (28,4–32,2)	0,081
Týden 32	32,0 (29,4–34,6)	29,5 (26,4–32,6)	<0,001
Tuková hmota (%)			
Den 0	35,1 (22,0–48,2)	34,4 (22,2–46,6)	0,778
Den 56	32,8 (21,8–43,8)	32,2 (20,4–44,0)	0,763
Týden 32	34,8 (21,0–48,6)	32,0 (21,5–42,5)	<0,001
HOMA-IR			
Den 0	2,2 (1,2–3,2)	2,0 (1,1–2,9)	0,435
Den 56	2,1 (1,0–3,2)	2,1 (1,1–3,1)	0,679
Týden 32	2,1 (0,6–3,6)	2,0 (0,8–3,2)	0,449
Cholesterol (mmol/l)			
Den 0	5,4 (4,1–6,7)	4,9 (3,8–6,0)	0,157
Den 56	5,5 (4,2–6,8)	4,6 (3,2–5,6)	0,330
Týden 32	5,6 (4,4–6,8)	4,4 (3,3–5,5)	0,247
Triglyceridy (mmol/l)			
Den 0	1,1 (0,6–1,6)	1,1 (0,5–1,7)	0,976
Den 56	1,2 (0,5–1,9)	1,1 (0,4–1,8)	0,987
Týden 32	1,1 (0,7–1,5)	1,2 (0,7–1,7)	0,506

Data jsou vyjádřena jako medián a interkvartilové rozpětí (IQR), p-hodnota byla odhadnuta pomocí Mann-Whitney U testu.

BMI = Body mass index – váhově-výškový index;

HOMA-IR = Homeostatic model assessment for insulin resistance – homeostatický model inzulinové rezistence;

WMS = weight-maintenance subjects - subjekty, které si hmotnost udržely;

WRS = weight-regain subjects - subjekty, které zvýšily hmotnost.

Všechny subjekty snížily významně svoji hmotnost (- 5,8 – 2,3 %, $p < 0,001$) a byly seskupeny podle úspěšnosti udržení váhového úbytku (znovunabytí úbytku do 10 % a nad 10 %). Na počátku (týden 0) nebyly mezi skupinami pozorovány v hladině mRNA žádné rozdíly ($p > 0,05$). Na konci období aplikace nízkokalorické diety (týden 8) však analýza odhalila, že pomocí vyšší hladiny mRNA genů RIPK3 a RNF216 v PBMC je

možné detekovat ty jedince, kteří jsou náchylnější ke znovuzískání hmotnostního úbytku 6 měsíců po nutriční intervenci ($p < 0,05$).

4.2.3 Vliv genů RIPK3 a RNF216 na tělesnou hmotnost

Zkoumání mechanismů, které se týkají udržování tělesné hmotnosti po jejím snížení pomocí nízkenergetické diety, je hlavním námětem mnoha studií. Některé současné strategie k dosažení udržení váhy jsou založeny na srovnávání genetické výbavy a potenciálních interakcí s příjmem potravy. Nicméně, jen několik výzkumných týmů zhodnotilo předpokládanou roli nutrigenomiky na regulaci a cyklování tělesné hmotnosti.

Studované geny (RIPK3 a RNF216) byly vybrány z microarray analýzy v PBMC vykonané dříve v laboratoři. Microarray analýza ukázala odlišnou expresi obou genů po nízkokalorické dietě. Kvůli tomuto faktu a zapojení obou genů v aktivaci NF κ B a jejich možné roli v energetické homeostáze a zánětlivém procesu, byly tyto geny vybrány, aby byl analyzován jejich vliv na udržení hmotnosti po nutriční terapii obezity.

V tomto smyslu, bylo hlavním cílem tohoto experimentálního pokusu analyzovat změny v expresi genů RIPK3 a RNF216 v PBMC u obézních pacientů, kteří byli podrobena nízkokalorické dietě a sledování během následující šestiměsíční kontrolní periody. Změny v hmotnosti během udržovací periody ukázaly širokou rozmanitost, která může být jednou z příčin absence spojení mezi touto rozdílností a úrovní genové exprese. Aby se vyloučila tato heterogenita změn tělesné hmotnosti, konkrétně těch během udržovací periody, byly brány v úvahu pouze subjekty, které získaly zpět maximálně 10% původní tělesné hmotnosti. Ty byly poté kategorizovány do dvou odlišných skupin (WMS a WRS) podle velkých nebo malých změn hmotnosti během šestiměsíční udržovací periody. Nejprve byl analyzován vliv udržení tělesné hmotnosti u antropometrických proměnlivých faktorů. Zde nebyly odhaleny žádné změny před zahájením a po ukončení aplikace nízkokalorické diety. Avšak jak bylo očekáváno podle kategorizačních kritérií, WMS subjekty ukázaly nižší hodnoty antropometrických a tělesných proměnných šest měsíců po ukončení nutriční intervence.

Ve vztahu k úrovni genové exprese ukázal tento výzkum možnost určit odlišnosti v regulaci tělesné hmotnosti pomocí profilování genové exprese v krevních buňkách.

Toto zjištění je obzvláště významné pro oblast nutrigenomiky, protože krev je nejsnadněji dostupná tkáň pro genové profilování v lidských intervenčních studiích. V základní hladině obou genů nebyly pozorovány žádné rozdíly, ale po nutriční léčbě WMS subjekty ukázaly nižší transkripční úroveň obou genů. Ve skutečnosti, během hubnutí mRNA hladina obou genů u WMS klesala, zatímco u WRS prodělávala vzestup.

O možných důvodech propojení mezi hladinou mRNA obou genů a znovuzískáním hmotnosti můžeme pouze spekulovat. Kódované proteiny obou genů se převážně vyskytují v cytoplazmě a tvoří komponentu komplexu signálního I-receptoru pro TNF, který může spustit apoptózu a aktivovat NFκB transkripční faktor. Díky roli v aktivaci jaderných transkripčních faktorů by mohly tyto geny ovlivňovat rozdílné metabolické dráhy spojené s obezitou a řízením tělesné hmotnosti a účastnit se zánětlivého procesu a apoptózy mezi ostatními procesy. Ve skutečnosti bylo již dříve popsáno, že transkripční faktor NFκB zprostředkující zánět by mohl být jedním z klíčových mechanismů podílejících se na vzniku a progresi obezity. Kromě toho bylo již dříve publikováno, že transkripce prozánětlivých genů regulovaných NFκB v PBMC je při obezitě zvýšená a uvažovalo se také o úloze těchto genů v regulaci tělesné hmotnosti.

Tato studie dále ukázala silné propojení mezi oběma geny během celé periody zkoušení a svědčí tak o společné účasti na řízení tělesné hmotnosti u obézních subjektů. Vztah mezi regulací tělesné hmotnosti a profilem genové exprese genů *RIPK3* a *RNF216* v PBMC u obézních subjektů dříve nebyl zvažován. Proto tato zjištění poskytují nový pohled na aplikaci neinvazivní techniky pro hodnocení terapie obezity založené na nutrigenomických přístupech.

Na druhé straně jedním z limitujících faktorů současné intervenční studie by mohla být velikost vzorku. Avšak je to srovnatelné s jinými intervenčními studiemi, které analyzují úroveň genové exprese v PBMC.

Tato studie tedy svědčí o tom, že exprese genů *RIPK3* a *RNF216* v PBMC u obézních subjektů je ovlivňována kalorickou redukcí a demonstruje, že po skončení nutriční intervence ti obézní jedinci, kteří později znovu získají větší tělesnou hmotnost šest měsíců po hubnoucí periodě, vykazují vyšší hladinu mRNA obou genů. Proto genová exprese těchto genů v PBMC by mohla identifikovat obézní jedince, kteří po úvodní úspěšné intervenci a snížení tělesné hmotnosti znovu zvýší tělesnou hmotnost.

Transkripční úroveň těchto genů by mohla sloužit jako nutrigenomický biomarker pro hodnocení výsledku léčby obezity. (*Goyenechea, 2009*)

5 Nutrigenomika, nutrigenetika a rizikové faktory kardiovaskulárního onemocnění

5.1 Genetické interakce s potravou ovlivňují kardiovaskulární choroby

5.1.1 Prevence kardiovaskulárních onemocnění podle genotypu jedince

Po mnoho let nám řada epidemiologických a intervenčních studií umožňovala charakterizovat faktory spojené se vzrůstajícím rizikem kardiovaskulárních chorob. Nyní máme uznávané vědecké směrnice a modely odhadující riziko, což nám dovoluje určovat, koho se riziko týká, proč a co můžeme dělat, abychom riziko minimalizovali. Samozřejmě ne všechny rizikové faktory kardiovaskulárních chorob jsou ovlivnitelné. Věk, pohlaví a genotyp ovlivnit nemůžeme, zatímco kouření, příjem alkoholu, fyzickou aktivitu, složení stravy a další rizikové faktory, jako hypertenzi, lipidový profil, porušenou glukózovou toleranci a nadváhu či obezitu ovlivnit můžeme, a to změnou životního stylu nebo farmaceutickou intervencí. Cílem snižování kardiovaskulárního rizika je zvýšit životní úroveň a dosáhnout zdraví i v co nejvyšším věku a vyhnout se tak negativním následkům ischemické choroby srdeční, mozkové příhody a periferního poškození cév.

Významnou a v současnosti se rozvíjející oblastí výzkumu vzniku a rozvoje kardiovaskulárních chorob je to, jak různé genetické variace interagují s faktory prostředí, zejména s přijatou potravou, a ovlivňují tak celkové kardiovaskulární riziko. Interakce mezi geny a prostředím je nedílnou součástí evoluce a zahrnuje také interakci mezi podskupinou genů a stravou, jejímž výsledkem je adaptace specifických nutrientů. Avšak strava se za posledních 200 let velmi změnila – příliš rychle na to, aby mohla být doprovázena srovnatelnou vývojovou adaptací – a tato disbalance vyústila ve spojitosti mezi určitými genetickými polymorfizmy a stravou a zvýšeným kardiovaskulárním rizikem.

S dostatečnými informacemi o interakci mezi specifickými genetickými polymorfizmy a stravou a kardiovaskulárním rizikem by bylo možné jedinci doporučit stravu podle vlastního genotypu.

5.1.2 Vliv genetického polymorfizmu apolipoproteinu A-I a příjmu polynenasycených mastných kyselin na HDL

Apolipoprotein (apo) A-I je klíčovou komponentou HDL. HDL je produkován játry a střevem a je zodpovědný za transport cholesterolu z periferních tkání zpět do jater, kde podléhá řadě komplexních reakcí spolu s ostatními lipidy, enzymy, transportními proteiny a receptory. Jak apo A-I, tak i HDL byly identifikovány jako protektivní kardiovaskulární faktory.

Genový kód apo A-I, *APOAI*, který se nachází na dlouhém raménku chromozómu 11, je vysoce polymorfní. Specifický SNP v jeho promotorové oblasti, známý jako *APOAI* – 75G→A, byl značně studován ve vztahu ke koncentraci apo A-I a HDL, ale výsledky nebyly shodné. Metaanalýza zahrnující některé tyto studie došla k závěru, že méně obvyklá alela A by mohla souviset s mírně zvýšenou ($\approx 0,05$ mg/dl) koncentrací apo A-I. Otázkou je, zda by tyto rozporuplnosti ve studiích mohly být výsledkem interakcí s nutričními faktory, které ovlivňují efekt tohoto genetického polymorfizmu.

Jedním ze způsobů, jak může strava ovlivnit expresi genu *APOAI* je příjem esenciálních mastných kyselin, ω -3 a ω -6 polynenasycených mastných kyselin (polyunsaturated fatty acids; PUFA). Studie na zvířatech ukazují, že příjem PUFA může modulovat genovou expresi několika enzymů účastnících se lipidového a sacharidového metabolismu. Ve studii, která zahrnovala 50 mužů a žen, se jedinci stravovali potravou bohatou buď na nasycené tuky, mononenasycené tuky nebo PUFA. Snížení koncentrace LDL spojené s příjmem PUFA, na rozdíl od příjmu potravy bohaté na nasycené tuky, bylo mnohem výraznější u žen se vzácnější alelou A než u žen s homozygotním genotypem pro alelu G. Tento jev nebyl tak patrný u mužů.

Jiná studie, která zkoumala 755 mužů a 822 žen, odhalila zřetelnou interakci týkající se hladiny HDL, a to mezi genotypem *APOAI* a příjmem PUFA. V této studii byly subjekty rozděleny do 3 skupin podle příjmu PUFA: nízký (< 4 % energetického příjmu), střední (4 – 8 % energetického příjmu) a vysoký (> 8 % energetického příjmu). U žen, nositelek alely A zřetelně vzrostla hladina HDL při vysokém příjmu PUFA. Opačný efekt byl pozorován u žen s homozygotním genotypem pro alelu G (koncentrace HDL klesala při vysokém příjmu PUFA). Příjem PUFA u mužů takový vliv na koncentraci HDL, ani na apoA-I neměl.

To znamená, že pokud je příjem PUFA menší než 4 % energetického příjmu, ženy s homozygotním genotypem pro alelu *G* mají přibližně o 14 % vyšší hladinu HDL než nositelky alely *A*. Pokud je příjem PUFA vyšší než 8 % energetického příjmu, bude hladina HDL u nositelek alely *A* o 13 % vyšší než u žen s genotypem *G/G*. Tento fakt zvyšuje možnost poskytnutí individuálního nutričního doporučení založeného na genotypu: ženy s alelou *A* by měly zvýšit příjem PUFA, aby zvýšily koncentraci HDL a snížily tak riziko kardiovaskulárního onemocnění, zatímco ženy s *G/G* by měly obdržet doporučení opačné.

5.1.3 Polymorfismus genu pro PPAR

Receptory aktivované peroxizomovými proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) jsou členy rodiny supergenů pro nukleární receptory a hrají jednu z klíčových rolí v oxidaci mastných kyselin a v extracelulárním metabolismu lipidů. PPAR receptory spojují mastné kyseliny a metabolity mastných kyselin a regulují expresi genů, které se účastní jejich transportu a metabolismu. Členy rodiny pro PPAR aktivují okolo 300 genů.

Gen pro PPAR- α má polymorfismus v kodónu *162* (*PPARA Leu162Val*), což je spojeno se změnami v koncentracích celkového cholesterolu, LDL a apo B. Při analýze 1128 mužů a 1244 žen ve Framinghamské studii byla přítomnost méně časté alely *V162* u mužů spojena se zřetelně vyšší sérovou koncentrací celkového cholesterolu, LDL, apo B a apo C-III než u mužů s alelou *L162*, a to i po přizpůsobení věku, BMI, kouření a užívání β -blokátorů nebo diuretik. U žen byl pozorován obdobný trend, ale byl méně výrazný.

Tento fakt nastoluje otázku, zda existuje souvislost mezi tímto polymorfismem a příjmem PUFA. Další výzkum 2106 mužů a žen z této studie ukázal, že pro osoby s běžnou alelou *L162* měl zvýšený příjem PUFA jen malý efekt na koncentraci triacylglycerolů nalačno. U osob s méně častou alelou *V162* však koncentrace triacylglycerolů nalačno se zvýšeným příjmem PUFA značně poklesla.

Z výše uvedeného vyplývá, že příjem PUFA souvisí tedy se dvěma polymorfizmy (*APOA1 – 75G→A* a *PPARA Leu162Val*). Tyto interakce ovlivňují riziko kardiovaskulárního onemocnění prostřednictvím působení na dva rizikové faktory – HDL a triacylglycerol, což komplikuje pokusy poskytnout nutriční doporučení založené na genotypu. Např. u jedince, který je homozygotem jak pro *APOA1 – 75G*, tak pro *PPARA*

L162, zvýšený příjem PUFA sníží hladinu HDL, ale neovlivní koncentraci triacylglycerolu. Tudíž celkový efekt znamená zvýšené riziko kardiovaskulárního onemocnění, proto je pacientovi doporučeno konzumovat méně PUFA. Osobám s alelou *APOA1 – 75T* a homozygotním genotypem pro *PPARA V162* by mělo být naopak doporučeno příjem PUFA zvýšit. Pro ostatní kombinace genotypu jsou zatím důkazy nedostačující k tomu, aby bylo vytvořeno jednoznačné doporučení, zda příjem PUFA zvýšit či snížit. Je třeba ještě další výzkum k tomu, aby se lépe porozumělo reálnější situaci, ve které se zohlední interakce nejen mezi vícero geny, ale i mezi faktory vnějšího prostředí.

5.1.4 Rozdílný efekt ω -6 a ω -3 polynenasycených mastných kyselin

Doposud byly PUFA považovány za jeden faktor. V současnosti se však analyzují jednotlivé rodiny ω -6 a ω -3 PUFA zvlášť. Rodina ω -3 PUFA se ve velkém množství nachází v mořských rybách, zatímco oleje na vaření, pomazánky a skryté tuky jsou většinou zdrojem ω -6 PUFA. Tyto dvě rodiny PUFA jsou součástí metabolického systému, který se vyvíjel mnoho milionů let a přizpůsobil se určitému preferovanému poměru ω -6 a ω -3 PUFA. Z různých důvodů se předpokládá, že tento poměr je v dnešní stravě narušen a ve stravě převažují většinou ω -6 PUFA.

Příjem ω -6 PUFA také interaguje s polymorfizmem *PPARA Leu162Val*. U osob s méně častou alelou *V162* je zvýšený příjem ω -6 PUFA spojen se zřetelným poklesem koncentrace triacylglycerolu, u nositelů alely *L162* nikoli. Jiný případ nastane, jestliže uvažujeme příjem ω -3 PUFA. Při vyšším příjmu ω -3 PUFA se u nositelů alely *L162* i *V162* vyskytuje prospěšný pokles koncentrace triacylglycerolu.

5.1.5 Rozdílný efekt ω -6 a ω -3 polynenasycených mastných kyselin na 5-lipoxygenázu

Interakce mezi genotypem a příjmem PUFA není limitován lipidovým metabolismem. 5-Lipoxygenáza je klíčovým enzymem v produkci leukotrienů z kyseliny arachidonové. Nedávná studie Dwyera a kol. (*Dwyer, 2004*) odhalila vztah mezi polymorfizmem v promotorové oblasti genu pro 5-lipoxygenázu a silou tuniky intimy a

médie karotidy u 470 zdravých žen a mužů ve středním věku z losangeleské studie (Los Angeles Atherosclerosis Study).

V této studii variace genotypu pro 5-lipoxygenázu bez běžné alely byla nalezena u 6,0 % subjektů. Síla tuniky intimy a média karotidy byla významně vyšší u nositelů dvou variant alely, když se zohlednil věk, pohlaví, výška a etnická skupina. Pozitivní souvislost mezi příjmem arachidonové kyseliny a zesílením stěny karotidy byla patrná u nositelů dvou variant alel, ale nikoli u nositelů běžné alely. Tato souvislost byla otupena vyšším příjmem ω -3 PUFA ve stravě.

Toto je tudíž další příklad, kdy příjem PUFA interaguje s genetickým polymorfismem enzymu začleněného do procesu vzniku kardiovaskulárního onemocnění. Tento důkaz vede ke zvyšování role genetického testování, na jehož základě může být vytvořeno individuální nutriční doporučení s cílem snížit riziko kardiovaskulárního onemocnění. (*Ordovas, 2006*)

5.2 Kombinace mnohočetných genetických rizikových faktorů je spojena s aterosklerózou karotidy

V zemích, které se přizpůsobily západu, umírá velký počet pacientů s diabetem druhého typu na kardiovaskulární choroby, a to hlavně kvůli pokročilé ateroskleróze. Ačkoli riziko kardiovaskulárních onemocnění roste s přibývajícím počtem obecných rizikových faktorů jako diabetes, hypertenze a dyslipidémie, nemohou tyto faktory zahrnovat celkové riziko kardiovaskulárních onemocnění. Jelikož je ateroskleróza komplexem multifaktoriálních a polygenních poruch, uvažuje se o tom, že je výsledkem interakcí mezi genetickými rizikovými faktory jedince a rozličnými faktory vnějšího prostředí. Aby se identifikovaly vnímavé geny, byly provedeny širokospektrý scanning SNP a analýza kandidátských genů. Výsledkem je identifikace různých kandidátských genů a lokusu představujícího predispozici ke kardiovaskulárním onemocněním. I když je možné, že některé z polymorfizmů těchto vnímavých genů jsou společně odpovědné za pokročilou aterosklerózu, několik studií uvedlo spíše zapojení kombinace potenciálně vnímavých genů do vzniku kardiovaskulárních onemocnění.

5.2.1 Měření IMT a výběr měřených subjektů

U japonských pacientů s diabetem druhého typu ($n = 690$; stáří > 50 let) byla pomocí ultrasonografické metody měřena síla tuniky intimy a média karotidy (intima-media thickness; IMT), což může být považováno za surogát koncového bodu kardiovaskulárních příhod. Zároveň se určoval jejich genotyp vztahující se k 106 SNP v kandidátských genech, které přispívají ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění, diabetu a vaskulárních komplikací diabetu. Mezi těmito 106 SNP bylo vybráno 40 běžných SNP (s frekvencí minoritní alely $\geq 10\%$). Nakonec se porovnávala průměrná hodnota IMT u subjektů s párem a bez páru čtyř genotypů vybraných ze 40 běžných SNP.

5.2.2 Statisticky významné kombinace SNP

Kombinace genotypu *MTHFR* 677 *TT* a lymfotoxinu- α (lymphotoxin- α ; *LTA*) 252 *GG* a kombinace genotypu *ACE* (angiotensin converting enzyme; angiotenzin konvertující enzym) *DD* a *LTA* 252 *GG* byly ohodnoceny jako statisticky významné ($P = 2,7 \times 10^{-9}$, resp. $P = 3,5 \times 10^{-6}$) pro nárůst průměru IMT (průměrně $1,54 \pm 0,60$ mm, resp. $1,43 \pm 0,58$ mm) v porovnání se subjekty bez těchto kombinací ($1,04 \pm 0,34$ mm, resp. $1,04 \pm 0,34$ mm)

5.2.3 Rizikové faktory aterosklerózy a kombinace SNP

Při analýze jednotlivých SNP nebyla nalezena významná spojitost s IMT karotidy. Přestože metoda hodnocení významu jednotlivých SNP byla pravděpodobně příliš přísná, aby se našly SNP kandidátských genotypů spojených se vznikem onemocnění, předpokládají tyto výsledky, že žádný jednotlivý SNP není rozhodující v určování IMT karotidy a je tedy obtížné odhadnout riziko aterosklerózy pouhou diagnózou genotypů SNP.

LTA, dříve nazývaný tumor nekrotizující faktor β , je strukturálně podobný *TNF- α* a hraje zásadní roli v zánětlivé odpovědi vyvoláním migrace monocytů a aktivací lymfocytů. Kromě toho u knockoutovaných myší s *LTA* byla pozorována redukce aterosklerotických lézí na rozdíl od knockoutovaných myší s *TNF- α* . Tento fakt tedy svědčí o tom, že *LTA* je důležitější v progresi aterosklerózy. Je známo, že polymorfismus *A252G* v genu pro *LTA*

je polymorfismus kódující aminokyselinu a vede ke zvýšení počtu molekul C-reaktivního proteinu, adhezivních molekul VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) a selektinu E, které jsou úzce spojeny se zánětlivým procesem a s rozvojem aterosklerózy.

Nezávislým rizikovým faktorem pro aterosklerózu je též hyperhomocysteinémie. K remethylaci homocysteinu na methionin je potřebný enzym MTHFR. Genotyp *677 TT* tohoto enzymu vede ke snížené aktivitě MTHFR a zvýšení hladiny homocysteinu v séru a eventuálně tedy i k rozvoji aterosklerózy.

Výsledky této studie nehodnotily vliv jednotlivých polymorfizmů *LTA 252 GG* a *MTHFR 677 TT* na IMT zvlášť. Pokud chceme stanovit, že jedinec má predispozice k ateroskleróze, je nutné otestovat polymorfizmy oba.

K rozvoji aterosklerózy by mohl přispívat též polymorfismus *I/D* (insertion/deletion) genu pro ACE. Tento polymorfismus ovlivňuje hladinu cirkulujícího ACE (nejvyšší plazmatické hladiny ACE byly nalezeny u jedinců s genotypem *DD*) a regulaci krevního tlaku. Zůstává však stále diskutabilní, zda tento SNP skutečně přispívá k rozvoji aterosklerózy. V této studii nebyl tento polymorfismus odpovědný za nárůst průměrné IMT a také neovlivňovat systolický, ani diastolický tlak. Kombinace genotypu *ACE DD* a *LTA 252 GG* však významně přispěla k nárůstu průměru IMT a u jedinců s touto kombinací se objevil vyšší systolický i diastolický tlak. Navíc byla u těchto jedinců zmíněná kombinace významně spojena s vysokou frekvencí historie starých infarktů myokardu.

I když stále zůstává nejasné, jak kombinace těchto SNP uplatňuje synergické vlivy na aterosklerózu karotidy a krevní tlak, výsledky studie ukazují, že tyto genotypy společně přispívají k rozvoji aterosklerózy karotidy a predispozici k ischemické chorobě srdeční. (Yamasaki, 2006)

5.3 Příjem tuků v potravě a genotyp

5.3.1 Vliv polymorfizmu v promotorové oblasti genu pro jaterní lipázu na koncentraci HDL

Dietní doporučení byla dlouhou dobu hlavní součástí prevence a léčby dyslipidémie, včetně nízké hladiny HDL jako rizikového faktoru pro srdeční onemocnění.

Nízká hladina HDL je typická při diabetu, obezitě a metabolickém syndromu. Doporučení pro prevenci a léčbu nízké hladiny HLD kladou důraz na snížení příjmu nasycených mastných kyselin a cholesterolu a zvýšení fyzické aktivity. Tato opatření mohou zároveň předcházet obezitě. Nicméně, snížení hladiny plazmatických lipidů v souvislosti se změnou stravovacích návyků je velmi variabilní a nemalý podíl na tom má genotyp každého jedince. Hladina lipidů v krvi je ovlivňována polymorfizmy v genech jednak pro apolipoproteiny a jednak pro enzymy. Příkladem takového enzymu je jaterní lipáza, která se účastní lipidového metabolismu. Je to lipolytický enzym hydrolyzující triacylglyceroly a fosfolipidy z plazmatických lipoproteinů. Zároveň hraje roli jako ligand v buněčném příjmu lipoproteinů. Vyšší koncentrace jaterní lipázy způsobuje přítomnost menších HDL částic o vyšší hustotě a tím i zvýšené riziko aterosklerózy.

Dřívější intervenční studie (*Chamberlain, 1998*) shledala, že při dietě s nízkým příjmem nasycených tuků a cholesterolu se znatelně zlepšila hladina lipidů, ale nebyl zaznamenán žádný měřitelný rozdíl v odpovědi u různých genotypů, kde se vyskytoval polymorfismus v genu pro jaterní lipázu (hepatic lipase gene; *LIPC*). Tato studie s 83 subjekty však pravděpodobně neměla možnost dostatečně detekovat slabý vliv genotypu (*Masson, 2005*).

Dále byly publikovány tři velké observační studie (*Ordovas, 2002; Tai 2003; Zhang 2005*), které se zabývají vlivem běžného polymorfizmu $-514C \rightarrow T$ v promotorovém genu *LIPC* na hladiny HDL v souvislosti s příjmem tuků v potravě. U 2130 mužů a žen účastnících se Framinghamské studie (*Ordovas, 2002*) vědci shledali, že méně obvyklý *TT* genotyp byl spojen se znatelně vyšší hladinou HDL pouze u subjektů, jejichž příjem tuků činil méně než 30% celkového energetického příjmu. Stejná interakce byla nalezena i u nasycených a mononenasycených tuků, nikoli však u polynenasycených tuků. Druhé podobné studie (*Tai, 2003*) se zúčastnilo 2170 subjektů asijské populace a zjistilo se, že Indové s celkovým příjmem tuků menším než 30% a s *TT* genotypem v $-514C \rightarrow T$ polymorfizmu měli nejvyšší koncentraci HDL. Tato interakce ale u Číňanů a Malajců v této studii neplatila a významné interakce pro nasycené a mononenasycené tuky nalezené Ordovasem a kol. (*Ordovas, 2002*) nebyly shledány ve studii vedené Taiem a kol. (*Tai, 2003*). Nicméně tyto dvě studie jsou v souladu s ostatními studiemi (*Ko, 2004; St-Pierre, 2003*), které ukazují, že *TT* genotyp v $-514C \rightarrow T$ je spojen s vyšší koncentrací HDL.

Třetí obdobná studie o interakci mezi příjmem tuků a $-514C \rightarrow T$ polymorfizmem, vedena Zhangem a kol. (*Zhang, 2005*), studovala skupinu 18 159 mužů, ze kterých bylo

vybráno 780 subjektů s diabetem druhého typu. Po zohlednění věku, kouření, příjmu alkoholu, pohybové aktivity a BMI byla nalezena vyšší hladina HDL u mužů s *CT* nebo *TT* genotypem, což je shodné s předchozími studiemi (*Ordovas, 2002; Tai 2003; Ko, 2004; St-Pierre, 2003*). Nicméně, Zhang a kol. (*Zhang, 2005*) našli významně vyšší hladinu HDL u mužů s *CT* nebo *TT* genotypem, kteří konzumovali větší množství tuku v potravě ($\geq 32\%$ celkového příjmu), nasycené tuky a mononenasycené tuky, což je očividně opačný výsledek než v předchozích dvou studiích. Tudíž interakční efekt příjmu tuků v potravě s *-514C→T* polymorfismem není replikovatelný.

Redden a Allison (*Redden, 2003*) diskutovali případy nereplikovatelnosti genetických asociačních studií týkajících se výzkumu obezity a diabetu, což by mohlo stejně tak zahrnovat i studie dyslipidemií. Důležitou příčinou nereplikovatelnosti je nedostatek statistické síly. Pro jakýkoli polygenetický model, jako jsou modely s komplexními fenotypy (např. obezita, dyslipidémie nebo diabetes typu 2), bude efektivní velikost jakéhokoli markeru nedostatečná, k tomu, aby se provedlo objektivní zhodnocení (*Risch, 2000*). Tudíž, je třeba studovat větší vzorek, aby se zhodnotila adekvátní síla sledovaného efektu.

V Zhangově studii (*Zhang, 2005*) je problém malého vzorku (navzdory skutečnosti, že bylo vyšetřováno přes 18000 mužů k identifikaci asi 800 s diabetem typu 2) ještě znásoben faktem, že *TT* genotyp je genotyp vyskytující se zřídka, zvláště v bílé populaci. Dále pouze 30 subjektů v této studii mělo homozygotní *TT* genotyp v *-514C→T* LIPC a subjekty s *CT* nebo *TT* genotypem byly hodnoceny dohromady. Zkoumáním dat Ordovase a kol. (*Ordovas, 2002*) a Taie a kol. (*Tai, 2003*) se zjistilo, že spád předpokládaných hodnot HDL ku celkovému příjmu tuků (jako procento energie) je výrazně negativní u osob s *TT* genotypem, zatímco u lidí s genotypem *CT* je pozitivní. V případě, že Zhangova data používala stejné vzory, kombinace malého počtu osob ($n = 30$) s *TT* genotypem s velkým počtem osob ($n = 247$) s *CT* genotypem by mohla maskovat vliv přijímaného tuku a *TT* genotypu na koncentraci HDL. Další komplikací je, že BMI a obézní fenotypy mohou interagovat s tukem v potravě a LIPC genotypem tak, že ovlivňují koncentraci HDL (*Tai, 2003; Zhang, 2005*). Tudíž, nereplikovatelnost Zhangovi studie je pravděpodobně způsobena malým počtem osob s *TT* genotypem. (*Fisler, 2005*)

5.3.2 Genetické polymorfizmy TNF- α modifikují souvislosti mezi příjmem polynenasycených mastných kyselin a hladinou HDL a apo A-I

5.3.2.1 Význam PUFA a TNF- α v organismu

Polynenasycené mastné kyseliny mají určitý protektivní charakter na kardiovaskulární systém, protože ovlivňují řadu rizikových faktorů včetně sérových lipidů. Je známo, že ω -3 PUFA, které jsou obsaženy hlavně v rybím tuku (kyselina eikosapentenenová; EPA a kyselina dokosaheptanenová; DHA), snižují plazmatické hladiny triacylglycerolů, zatímco ω -6 PUFA redukuje hladiny celkového cholesterolu a LDL. Ovlivnění hladin dalších lipidů a lipoproteinů těmito dvěma skupinami PUFA není jednotné. Pro tyto neshody neexistují jasné důvody. S dyslipidemií je spojován chronický zánět, který by mohl objasňovat efekty PUFA na lipidový metabolismus.

PUFA jsou prekurzory prostaglandinů a leukotrienů a také ovlivňují expresi různých genů účastnících se zánětlivého procesu. Tumor nekrotizující faktor α je hlavním prozánětlivým cytokinem, který je spojen s pozměněným lipidovým profilem, inzulínovou rezistencí a zvýšeným rizikem kardiovaskulárních chorob. Různé typy mastných kyselin, jako jsou ω -3 a ω -6 PUFA, modulují produkci TNF- α v lidském organismu. Ukázalo se, že genetický polymorfizmus TNF- α ovlivňuje účinek potravou přijímaných ω -3 PUFA na produkci TNF- α v lidském organismu. TNF- α pozměňuje lipidový metabolismus tak, že indukuje lipolýzu v tukové tkáni, zvyšuje lipogenezi v játrech a zhoršuje profil sérových lipidů. TNF- α také pozměňuje expresi genů účastnících se metabolismu lipidů. Příkladem může být lipoproteinová lipáza (lipoprotein lipase; LPL), receptory aktivované peroxizomovými proliferátory (PPAR), apolipoprotein (apo) A-I, apo A-IV a apo E a dále S-lecithin-cholesterolacyltransferáza (lecithin:cholesterol acyltransferase; LCAT).

V promotorové oblasti genu pro TNF- α byly nalezeny dva hlavní polymorfizmy, které pozměňují transkripční aktivitu. Polymorfizmus jediného nukleotidu v pozici -238G \rightarrow A snižuje míru transkripce a produkce cytokinů, zatímco SNP v pozici -308G \rightarrow A oba jevy zvyšuje.

TNF- α inhibuje působení inzulínu. U pacientů s diabetem typu 2 je velmi často nalezen chronický zánět. Proto bylo zkoumáno, zda TNF- α genotypy modifikují spojitosti mezi příjmem PUFA a koncentrací sérových lipidů u jedinců s diabetem typu 2.

.5.3.2.2 Metoda měření

Do studie bylo zahrnuto 53 mužů a 56 žen ve věku 42 – 75 let s diabetem typu 2. Příjem potravy byl odhadnut s použitím třídních záznamů o příjmu potravin a nápojů a hladiny lipidů v séru nalačno byly určeny ze vzorků krve, které se postupně odebíraly. Z krve se izolovala DNA a provedl se genotyping polymorfizmů $-238G \rightarrow A$ a $-308G \rightarrow A$ metodou polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction; PCR), kdy se určil polymorfismus délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism; RFLP).

.5.3.2.3 Vliv genotypu na hladinu HDL

Příjem PUFA byl spojen se sérovou hladinou HDL u nositelů alely $-238A$ pozitivně ($\beta = 0,06 \pm 0,03$ mmol/L na 1% energie z PUFA, $P = 0,03$), ale u nositelů genotypu $-238GG$ negativně ($\beta = -0,03 \pm 0,01$, $P = 0,03$) ($P = 0,004$ pro interakci). Příjem PUFA byl nepřímo úměrný hladině HDL u nositelů $-308A$ ($\beta = -0,07 \pm 0,02$, $P = 0,02$), ale ne u nositelů genotypu $-308GG$ ($\beta = 0,02 \pm 0,02$, $P = 0,13$) ($P = 0,001$ pro interakci).

Silnější interakce mezi geny a stravou byla pozorována, když byl polymorfismus na dvou pozicích ($-238/-308$) kombinován ($P = 0,0003$). Podobné efekty byly pozorovány u apolipoproteinu A-I, ale ne u příjmu jiných mastných kyselin a sérových lipidů.

.5.3.2.4 Rozdílné efekty $TNF-\alpha$ a suplementace PUFA

Cílem bylo určit, zda různé $TNF-\alpha$ genotypy modifikují spojitost mezi příjmem PUFA v potravě a cirkulujícími lipidy u jedinců s diabetem typu 2. Výsledky studie ukázaly, že zvýšený příjem PUFA znamená vyšší hladinu HDL a apo A-I u jedinců s genotypem $TNF-\alpha$ spojeným s nižší produkcí $TNF-\alpha$. Jak $\omega-3$, tak $\omega-6$ PUFA mají různé účinky na hladiny HDL. Některé z těchto heterogenit by mohly objasňovat genetické faktory ovlivňující produkci $TNF-\alpha$.

Vysoká koncentrace $TNF-\alpha$ je v lidském organismu spojena s nízkou koncentrací cirkulujících částic HDL. Několik studií ukázalo, že $TNF-\alpha$ může nezávisle ovlivňovat hladiny HDL prostřednictvím zvýšené činnosti endoteliální lipázy, snížené činnosti enzymu LCAT, snížené činnosti transportních ABC proteinů (ATP-binding cassette;

ABCA1 a ABCG1), scavenger receptorů třídy B typu I (scavenger receptor class B type I; SR-BI) a prostřednictvím snížené genové exprese apolipoproteinu A-I a A-IV. Každý z těchto proteinů úzce souvisí s regulací zpětného transportu cholesterolu. Krom toho, anti-TNF- α terapie u pacientů s revmatoidní artritidou způsobuje vzestup koncentrace HDL.

PUFA se mohou začleňovat mezi membránové fosfolipidy a aktivovat transkripci transkripčního faktoru NF κ B (nuclear transcription factor κ B), který reguluje expresi genu pro TNF- α . Avšak studie zabývající se vlivem PUFA na produkci TNF- α ukazují rozdílné výsledky. Ve skutečnosti bylo dokázáno, že jak ω -3, tak ω -6 PUFA v lidském organizmu, u zvířat a v buněčných kulturách produkci TNF- α buď zvyšují, nebo snižují. Výzkum Wallace a kol. (Wallace, 2000) ukázal, že očividně odlišné vlivy PUFA na produkci TNF- α by mohly být částečně vysvětleny stavem aktivity jednotlivých buněk a jejich odlišnou schopností tvořit prostaglandin E₂ (PGE₂) a leukotrien B₄, což jsou eikosanoidy produkované z PUFA a ovlivňují produkci TNF- α . Tito vědci také zjistili, že krysy krmené potravou bohatou na ω -3, popř. ω -6 PUFA měly nižší produkci TNF- α v zánětlivých makrofázích indukovaných thioglykolátem, ale vyšší produkci v nezápětlivých rezidentních makrofázích. Proto se tedy zdá, že zánětlivý stav buněk, který by mohl být určen genetickými faktory, částečně ovlivňuje efekt PUFA na produkci TNF- α .

V současné studii byl zvýšený příjem PUFA spojen s nižší koncentrací HDL a apo A-I u jednotlivců s genotypem s vyšší produkcí TNF- α , ale u jedinců s genotypem s nižší produkcí tohoto cytokinu byla po vyšším příjmu PUFA koncentrace HDL i apo A-I naopak vyšší.

Dále bylo zjištěno, že polymorfismus TNF- α -238G \rightarrow A snižuje rychlost transkripce a produkci TNF- α , zatímco polymorfismus TNF- α -308G \rightarrow A oboje zvyšuje. Grimble a kol. (Grimble, 2002) ukázali, že mezi jednotlivci s největší produkcí TNF- α , těmi, kteří jsou nositeli alely TNF- α -308A, se projevila znatelně větší redukce v produkci TNF- α po příjmu rybího tuku. U jedinců s genotypem -308GG tomu tak nebylo. Je tedy pravděpodobné, že polymorfismy TNF- α způsobují změny v produkci TNF- α dle příjmu PUFA v potravě, což následně moduluje zánětlivý stav buněk a ovlivňuje zpětný transport cholesterolu.

Neméně důležitým faktorem ovlivňujícím produkci TNF- α je i množství zkonsumovaných PUFA. Renz a kol. (Renz, 1988) prokázali, že PGE₂, který je odvozen od PUFA, stimuloval uvolňování TNF- α z krysích rezidentních makrofágů při nižší

koncentraci PGE₂, zatímco při vyšší koncentraci prostaglandinu uvolňování TNF- α potlačoval.

Nicméně Trebble a kol. (Trebble, 2003) zjistili, že u lidí suplementace ω -3 mastnými kyselinami v různých množstvích vede k produkci TNF- α ve tvaru „U-křivky“. Proto množství stimulu určuje, zda je produkce TNF- α zvýšená nebo potlačená. V této studii bylo dokázáno, že koncentrace HDL závisí nejen na množství zkonsumovaných PUFA, ale i na TNF- α genotypu každého jedince.

PUFA jsou přirozenými ligandy pro transkripční faktory PPAR, které zvyšují hladiny HDL a apo A-I. PPAR a TNF- α se mohou vzájemně ovlivňovat tak, že PPAR snižují genovou expresi TNF- α a TNF- α může snižovat expresi PPAR. Vysoké koncentrace PUFA spojeny s vysokými koncentracemi TNF- α mohou tedy potlačovat expresi PPAR, čímž snižují koncentrace HDL. Pokud jsou však vyšší koncentrace PUFA spojeny s nižšími koncentracemi TNF- α , mohou být přednostně aktivovány PPAR a výsledkem je pak vzestup hladin HDL. To by mohlo vysvětlovat, proč by vyšší příjem PUFA zvyšoval hladinu HDL u jedinců s genotypem spojeným s nižší produkcí TNF- α , ale snižoval hladinu HDL u jedinců s genotypem s vyšší produkcí TNF- α .

Polymorfizmy v promotorové oblasti genu pro TNF- α tedy pozměňují spojitosti mezi potravou přijatými PUFA a cirkulujícími hladinami HDL a apo A-I. Dále je třeba v budoucích studiích potvrdit tyto poznatky i v dalších populacích a stanovit mechanismus účinku a typ PUFA (ω -3 nebo ω -6) zodpovědný za výše zmiňované účinky. (Fontaine-Bisson, 2007)

6 Nutrigenomika, nutrigenetika a diabetes mellitus typu 2

6.1 Geny, strava a diabetes mellitus 2. typu

6.1.1 Výskyt diabetu mellitu druhého typu stoupá

O diabetu mellitu je široce známo, že je zásadní příčinou velké řady zdravotních problémů, obzvláště pak kardiovaskulárních onemocnění. Postihuje více než 170 miliónů jedinců na celém světě. Existuje dostatek důkazů o tom, že se výskyt tohoto onemocnění bude dále zvyšovat, a to především dramatickým nárůstem v rozvojových zemích Afriky, Asie a jižní Ameriky.

U diabetu druhého typu způsob života, obzvláště ty faktory životního stylu, které vedou k obezitě, přispívá k rozvoji onemocnění. V průmyslových zemích je zvýšený příjem tuků, nasycených mastných kyselin a vysoký celkový energetický příjem doprovázen sníženou fyzickou aktivitou, nedostatečným příjmem vlákniny a potravin s nízkým glykemickým indexem. Tento vývoj doposud vyústil v 6% prevalenci onemocnění, z čehož 4 % tvoří obézní bílí adolescenti. Dále je třeba zmínit i 25% prevalenci porušené glukózové tolerance.

Strava a obezita jsou tedy hlavními faktory ovlivňujícími vznik, rozvoj a závažnost diabetu druhého typu.

6.1.2 Diagnóza diabetu a obezity

Podle doporučení WHO (1999) diagnóza diabetu zahrnuje jak koncentraci glukózy v krvi nalačno, tak koncentraci po dvouhodinovém perorálním glukózovém tolerančním testu (oral glucose tolerance test; oGTT). Porušená glukózová tolerance přináší riziko makrovaskulárních komplikací. S obezitou a fyzickou inaktivitou je pak úzce spojen vznik inzulinové rezistence. Mnoho cirkulujících hormonů, cytokinů a metabolických působků, jako jsou neesterifikované mastné kyseliny (non-esterified fatty acids; NEFA), se tvoří v adipocytech a moduluje působení inzulínu. Zvýšené množství zásobních triacylglycerolů, zvláště v podobě dep viscerálního a podkožního tuku, vede k tvorbě velkých adipocytů, které jsou pak rezistentní ke schopnosti inzulínu potlačovat lipolýzu.

Výsledkem je zvýšené uvolňování a zvýšená hladina cirkulujících NEFA a glycerolu, což zhoršuje inzulínovou rezistenci v kosterních svalech a játrech.

6.1.3 Dědičnost diabetu

Mnoho studií po celém světě se zabývá dědičností diabetu. Ukazuje se, že u vzniku diabetu typu 2 se uplatňují genetické faktory i faktory vnějšího prostředí a má tendenci výskytu v rodině. Tudíž riziko vzniku diabetu stoupá, pokud je pozitivní rodinná historie onemocnění. Přibližně u 15 – 25 % přímých příbuzných pacientů s diabetem typu 2 se rozvine buď porušená glukózová tolerance nebo diabetes. Když byla studována prevalence diabetu a porušené glukózové tolerance (průřezové i longitudinální studie) v kohortě 199 potomků rodičů diabetiků, byl výskyt diabetu do věku šedesáti let odhadnut na přibližně 60 %. Podíl shody u dvojčat se lišil. Pohyboval se mezi 35 % a 85 % u monozygotních dvojčat a při zahrnutí porušené glukózové tolerance vzrostl na 88 %, zatímco u dizygotních dvojčat byl 17 – 20 %.

6.1.4 Skladba výživy u diabetu

Skladba výživy je klíčovou komponentou pro dlouhodobé zdraví a vysokou kvalitu života lidí s diabetem typu 2. Obecné nutriční principy a doporučení jsou stejné pro lidi s diabetem i bez něj. Je však důležité stanovit si reálné cíle, které jsou ve shodě s příjmem mikro- a makronutrientů, fyzickou aktivitou, způsobem života a zdravotními potřebami každého jedince. Snahou diabetického managementu je pomoci jedincům a jejich rodinám získat nezbytné znalosti, životní dovednosti, možnosti a podporu potřebnou k dosažení optimálního zdraví.

Cílem kontroly diabetu je udržet hladiny glukózy co možná nejbližší normálním hodnotám a vyvarovat se hladinám příliš vysokým (hyperglykémie) i příliš nízkým (hypoglykémie). Strava, kontrola hmotnosti a fyzická aktivita pomáhají glykémii zlepšovat. Obecná doporučení zahrnují 50 – 60 % denního energetického příjmu ve formě sacharidů s nízkým glykemickým indexem, potraviny s vysokým obsahem vlákniny a příjem bílkovin nejméně 0,86 g/kg/den. Konzumace přidaných cukrů může být do 10 % denního energetického příjmu. Dále se doporučuje snížit celkový příjem tuků, hlavně

nasycených mastných kyselin, používat přiměřené množství sladidel, dodržovat potřebný přísun vitamínů a minerálů a zvýšit fyzickou aktivitu.

Stále trvající snahy o pochopení vztahů mezi genomem a stravou, tedy nutrigenetika a nutrigenomika, nyní pozměnily vymezení kontroly diabetu. Obě disciplíny se snaží objasnit interakce genomu a stravy, určit optimální dietu pro jednotlivce a vysvětlit, jak genetická výbava jedince odpovídá na stravu nebo jak souvisí odlišné fenotypy s rozdíly v buněčné nebo genetické odpovědi.

6.1.5 Kandidátské a vnímavé geny

Hledání kandidátských genů vede k identifikaci genových variant, které ovlivňují onemocnění. Jestliže studie jasně ukáže, že daná varianta má významný efekt na fenotyp spojený s onemocněním, označí se jako vnímavý gen. Přesvědčivé doklady pro zapojení genové varianty mezi rizikové faktory onemocnění poskytují metaanalýzy. Nejpresvědčivější důkazy vytvářejí metaanalýzy mnohočetných publikovaných studií a umožňují tak určování vnímavých genů mezi geny kandidátskými. Vždy by ale mělo být bráno v úvahu, zda jde o onemocnění heterogenní nebo polygenní (např. diabetes typu 2). Studie jednoduché genové varianty by nemusely být přesvědčivé a v souladu s ostatními studiemi. Příspěvek genové varianty k onemocnění a související fenotyp je spolehlivější, pokud se jedná o studii interakcí mezi geny.

Varianty mnoha kandidátských genů pro diabetes mellitus druhého typu jsou rozsáhle studovány již dvě desetiletí. Mezi takové geny patří *KCNJ11*, který kóduje Kir6.2, *TCF7L2*, polymorfismus *Gly972Arg* v *IRS1*, polymorfismus *Gly1057Asp* v *IRS2*, polymorfismus *Trp64Arg* v genu kódujícím β_3 adrenergní receptor a *-308 G/A* promotorová varianta v *TNF*.

.6.1.5.1 *Kalpain-10*

První „běžný gen pro diabetes“ chápán tímto způsobem byl *CAPN10* v oblasti chromozómu 2 v lokusu NIDDM1 (non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus). Kóduje kalpain-10, cysteinovou proteázu, která je všudypřítomně vyjádřena. Původně byla alela *G* nekódujícího SNP (*UCSNP-43*) spojena s diabetem typu 2. Riziko rozvoje diabetu typu 2 však není plně připsatelné pouze SNP genu pro kalpain-10, ale je výsledkem kombinace haplotypů tvořených třemi SNP: *SNP-43*, *SNP-19* a *SNP-63*. Všechny tyto tři SNP jsou

obklopeny introny a je hodně pravděpodobné, že společně ovlivňují genovou expresi. V pozdějších studiích tento jev potvrzen nebyl, ale byl nalezen jiný SNP (*UCSNP-44*) související s diabetem typu 2. Genetické variace v genu pro kalpain-10 mohou tedy ovlivňovat citlivost k inzulínu, inzulínovou sekreci, nebo vztah mezi oběma jevy.

.6.1.5.2 Kir6.2

Draslíkové ATP-senzitivní kanály v pankreatických β -buňkách (pancreatic β -cell ATP-sensitive K^+ channels; KATP channels) jsou rozhodující pro regulaci sekrece inzulínu spřažením buněčného metabolismu a membránové elektrické aktivity. KATP kanál je tvořen dvěma podjednotkami: vnitřním draslíkovým kanálem, Kir6.2 (kódovaný genem *KCNJ11*) a sulfonylmočovinným receptorem, SUR1 (kódovaný genem *ABCC8*). Geny *ABCC8* a *KCNJ11* jsou umístěny na chromozómu 11p15.1 a několik variant těchto genů souvisí s poruchou sekrece inzulínu a diabetem typu 2. Statistický nejsilnější souvislosti s diabetem v *KCNJ11* mají SNP 74 (3p+215), 76 (A190) a 77 (E23K). Avšak při náchylnosti k diabetu typu 2 hraje dominantní roli varianta aminokyseliny E23K.

.6.1.5.3 TCF7L2

Grand a kol. (Grand, 2006) identifikovali *TCF7L2* jako nový vnímavý gen pro diabetes typu 2 a odhalili souvislost s mikrosatelitním markerem *DG10S478* v intronu 3. Spojená tetranukleotidová repetice má 6 alel, jmenovitě 0, 4, 8, 12, 16 a 20. Společná nenulová alela *DG10S478* (označena jako *X*) souvisela se zvýšeným rizikem u třech nezávislých populací (dánskou, islandskou a americkou). Složená riziková alela *X* byla téměř plně dána do vztahu s alelou *T* polymorfizmu *rs12255372*, zatímco alela *G* byla spojena s nulovou alelou. Alela *T rs12255372* tudíž také prokázala spojitost s diabetem typu 2. Poměrně nedávno byla potvrzena hypotéza, že *TCF7L2* je pravým vnímavým genem pro diabetes typu 2. Objasněním mechanismu, kterým vedou změny ve funkci nebo regulaci tohoto transkripčního faktoru ke ztrátě výkonu β -buněk a/nebo citlivosti k inzulínu, je pravděpodobně možné poskytnout nový zásadní pohled na patogenezi onemocnění.

.6.1.5.4 Ostatní geny

Cytokiny vzniklé v tukové tkáni, TNF- α a IL-6, by mohly několika mechanismy ovlivňovat rozvoj diabetu. Zvýšené hladiny těchto cytokinů jsou spojovány s rizikem vzniku diabetu.

Geny kódující proteiny důležité pro funkci pankreatických β -buněk jsou obzvláště dobrými kandidátskými geny pro diabetes typu 2. Studie rozvoje diabetu u mladých lidí a na myších ukázaly, že mutace v transkripčních faktorech důležitých pro vývoj, diferenciaci a zachování pankreatických β -buněk může způsobit diabetes. *EIF4A2*, gen kódující eukaryotickou translaci iniciačního faktoru $4\alpha 2$ je všudypřítomná RNA helikáza účastnící se iniciace proteinové translace. V krysích buňkách β -INS832/13 vystavených vysokým koncentracím glukózy je její aktivita snížena. Tudíž *EIF4A2* nejspíš přispívá k regulaci produkce inzulínu podle hladiny glukózy. Cheyssac a kol. (*Cheyssac, 2006*) nedávno informovali o tom, že SNP v tomto genu byl významně spojen s diabetem typu 2 diagnostikovaným před 45 lety.

Jaterní jaderný faktor-4 α (hepatocyte nuclear factor-4 α ; HNF-4 α) je transkripční faktor známý jako klíčová molekula ve vývoji a fungování β -buněk. V dřívější japonské studii (*Mori, 2002*) vědci pozorovali vazbu diabetu typu 2 na oblast chromozomu 20q12-q13, kde se právě nachází gen *HNF4A*. Současné studie informují o spojitosti mezi diabetem typu 2 a polymorfizmem v promotorové oblasti P2 specifické pro β -buňky.

Všudypřítomně vyjádřená proteinová tyrozin fosfatáza-1B (protein tyrosine phosphatase-1B; PTP1B) kódovaná genem *PTPNI* katalyzuje defosforylaci tyrozinových zbytků z aktivačního segmentu kinázy inzulínového receptoru a IRS1 vedoucí k down-regulaci signalizace inzulínem. PTP1B také inhibuje signalizaci leptinem prostřednictvím defosforylace kinázy JAK2 (Janus kinase 2) a STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). Narušení genu *PTPNI* u myši vede ke zvýšení citlivosti na inzulín a k odolnosti vůči obezitě vyvolané stravou a rovněž se normalizuje hladina glukózy v krvi. Několik studií se zabývalo spojitostí mezi diabetem typu 2 a genetickými variacemi genu *PTPNI*. Bento a kol. (*Bento, 2004*) po analyzování genového lokusu našli přesvědčivou spojitost mezi mnohočetnými SNP a diabetem typu 2 u dvou nezávislých skupin bílých Američanů ve studiích případ – kontrola. Nedávno publikovaná data tedy ukazují, že variace genu *PTPNI* mohou modifikovat lipidový profil a tím ovlivňovat náchylnost k metabolickému syndromu.

.6.1.5.5 *PPARG* jako vnímavý gen diabetu typu 2

PPAR γ je kódován genem *PPARG* a vystupuje jako transkripční faktor, který je aktivován určitými mastnými kyselinami, prostanoidy a thiazolidindiony. PPAR γ 1 je vyjádřen ve většině tkání, zatímco PPAR γ 2 je specifický pro tukovou tkáň, kde reguluje

adipogenní diferenciaci. Vysoce riziková prolinová alela polymorfizmu *Pro12Ala* pro PPAR γ má 75%-ní prevalenci u bělochů. Alaninová alela redukuje riziko o 21 – 27 %. Genotyp s alaninem vede podle všeho k větší citlivosti na inzulín. Variace s prolinem má nižší transkripční aktivitu a knockoutované myši s heterozygotním genotypem PPAR γ mají vyšší inzulínovou rezistenci.

Tichá substituce *C143IT* v šestém exonu *PPARG* je polymorfizmus, který moduluje vliv *Pro12Ala* na sklon k diabetu typu 2. Tento polymorfizmus je protektivní proti mírné hyperglykemii nalačno a diabetu typu 2 během šestiletého sledování u subjektů, kteří byly na počátku normoglykemičtí. Polymorfizmus *C143IT* v šestém exonu *PPARG* byl také spojen s nižším rizikem vzniku onemocnění. Významná interakce byla též popsána mezi polymorfizmem *Leu162Val* v PPAR α a příjmem ω -6 PUFA. U osob s méně častou alelou *V162* je zvýšený příjem ω -6 PUFA spojen se značnou redukcí koncentrace triacylglycerolů. U nositelů alely *L162* tato asociace pozorována není.

.6.1.5.6 Adiponektin

Koncentrace adiponektinu je ve vztahu nepřímé úměry s hladinou glukózy, inzulínu a triacylglycerolu a stejně tak i s BMI, zatímco s koncentrací HDL, hladinou cholesterolu a s inzulínem stimulovaným vychytáváním glukózy je ve vztahu přímé úměry. Kromě toho vysoká plazmatická koncentrace adiponektinu chrání před rozvojem diabetu typu 2. Gen *adiponektin/ACDC* je umístěn na chromozómu 3q27 na lokusu, který má vztah právě k diabetu druhého typu a dále také k několika fenotypům metabolického syndromu. Polymorfizmy genu *APM1* kódujícího adiponektin byly spojeny s rozvojem hyperglykemie. Hladiny adiponektinu a citlivost na inzulín jsou pak ovlivněny dědičnými variacemi na lokusu *ACDC*, které jsou součástí genetického pozadí vzniku diabetu typu 2.

Dva předpokládané adiponektinové receptory – adiponectin receptor 1 (AdipoR1) a adiponectin receptor 2 (AdipoR2) – byly klonovány. Oba receptory jsou zřetelně vyjádřeny v játrech, svalech a tukové tkáni. Jejich úroveň exprese ve svalech odpovídá jasným metabolickým parametrům, hlavně první fázi sekrece inzulínu pro AdipoR1, ale jejich vztah s citlivostí na inzulín není zcela prokázán. Expres obou receptorů je nižší u jedinců s normální glukózovou tolerancí, kteří mají rodinný výskyt diabetu. Polymorfizmus *ADIPOR1* má zároveň prokázáný vliv na genetické riziko vzniku diabetu typu 2.

6.1.6 Strava a interakce geny-strava

Stravovací doporučení pro běžnou populaci jsou vhodná i pro osoby s diabetem druhého typu. Jelikož je mnoho lidí s tímto onemocněním obeztních a má inzulínovou rezistenci, měla by nutriční terapie zdůraznit změny životního stylu, které povedou ke snížení příjmu energie a zvýšení jejího výdeje prostřednictvím fyzické aktivity. Velkému počtu lidí s diabetem je též diagnostikována dyslipidémie a hypertenze, což vyžaduje redukováný příjem nasycených tuků, cholesterolu a sodíku.

Pokud se zkoumá účinek tuků přijatých ve stravě na inzulínovou rezistenci, podá se obvykle zvířatům potrava obsahující lůj (převážně nasycené tuky), olivový olej (hlavně nenasycené tuky), slunečnicový olej (převážně ω -6) a rybí tuk (bohatý na ω -3). Ze zvířecích studií se pak získá jádro důkazů, které prokazují spojitost mezi lipidy ze stravy, profilem lipidů v membránách a inzulínovou rezistencí. Průkopnická studie Storliena a kol. v roce 1987 (*Storlien, 1987*) ukázala, že pouze nahrazení slunečnicového oleje (ω -6) rybím tukem (ω -3) u krys krmených potravou bohatou na sacharózu a tuky zmírní rozvoj inzulínové rezistence. U populace z Pimy mající sklon k obezitě a diabetu typu 2 se prokázalo, že mají o 40 % nižší hladinu ω -3 v lipidových membránách ve svalech než Australané.

Kopecký a kol. (*Kopecky, 2002*) ukázali, že defekt mitochondriálního systému rozpojovacího proteinu (uncoupling protein; UCP) může vést k obezitě a k následné inzulínové rezistenci. Syntéza UCP je regulována rodinou transkripčních faktorů PPAR γ , které zase mohou být regulovány mastnými kyselinami. V současnosti je podporován fakt, že polynenasycené mastné kyseliny mohou vystupovat jako ligandy receptoru PPAR γ nebo mohou modulovat jeho expresi a tak zvyšovat transkripci a syntézu GLUT4 a rozvíjet inzulínovou rezistenci. Polymorfismus *Pro12Ala* genu pro PPAR γ 2 úzce souvisí s příjmem MUFA a s BMI. Obeztní lidé s alelou *Ala-12* mají vyšší hodnoty HOMA-IR, obzvláště když je jejich příjem MUFA nízký.

Další gen týkající se interakce geny-strava u diabetu typu 2 je gen *Rad*. Je to typický člen RGK rodiny GTPáz spojených s *Ras*, která obsahuje také *Gem/Kir*, *Rem* a *Rem2*. *Rad* byl původně nalezen jako gen s nadměrnou expresí v kosterních svalech pacientů s diabetem typu 2. Ilany a kol. (*Ilany, 2006*) vyvinuli transgenní (Tg) myši s nadměrnou expresí genu *Rad* ve svalech. Rad-Tg myši jeví normální růst a vývoj a stejně tak i normální glukózovou homeostázu a citlivost na inzulín. Pokud však byly

Rad-Tg myši krmeny potravou bohatou na tuky, objevila se u nich větší inzulínová rezistence a glukózová intolerance než u normálních myši při podávání stejné potravy. Kombinace tučné potravy a nadměrné exprese genu *Rad* způsobily výrazněji snížené vychytávání glukózy stimulované inzulínem než tučná potrava sama. Nadměrná exprese genu *Rad* ale sama transport glukózy nemění. Tudíž interakce tučné stravy a nadměrné exprese *Rad* zhorší inzulínovou rezistenci ve svalech.

Perilipin, který je kódován genem *PLIN*, je hlavním proteinem spojeným s uskladněním tukových kapének v adipocytech a jedním ze zásadních regulátorů lipidové mobilizace. Spojení mezi perilipinem, tělesným tukem a inzulínovou rezistencí bylo demonstrováno na myších modelech, které ukázaly redukci tělesného tuku a paradoxně zvýšené riziko glukózové intolerance a periferní inzulínové rezistence. Ve vztahu mezi perilipinem a tělesnou hmotností hrají roli dietní faktory. Polymorfismus v genu *PLIN* ovlivňuje ztrátu hmotnosti jako odpověď na nízkoenergetickou dietu. Genetické variace v lokusu tohoto genu modulují účinky běžného tuku a sacharidů ze stravy na inzulínovou rezistenci u velkého vzorku běžné populace asijských žen. Mezi příjmem tuků a sacharidů a polymorfismem genu *PLIN 11482GA* a *14995AT* byla nalezena statisticky významná interakce geny-strava.

Genetická variabilita genu *SCARB1* hraje u lidí významnou roli v lipidovém metabolismu. Současné poznatky ukazují, že přítomnost alely *A* v polymorfismu *SCARB1* v exonu 1 je spojena se statisticky významným vzestupem citlivosti na inzulín po konzumaci stravy bohaté na MUFA v porovnání s jedinci s alelou *G/G*. Gen pro protein 2 vázající mastné kyseliny (fatty acid binding protein 2; FABP2) kóduje intestinální FABP (IFABP), což je člen rodiny malých (14 – 15 kDa) intracelulárních proteinů vázajících lipidy. Gen umístěný na 4q28-q31 má stabilně 4 exony a 3 introny charakteristické pro tuto rodinu genů. IFABP je klíčový pro absorpci a transport tuku: příjem a transport nasycených i nenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem (long-chain fatty acids; LCFA), nasměrování volných mastných kyselin (free fatty acids; FFA) do různých metabolických cest, ochrana cytosolu před cytotoxickými vlivy FFAs a modulace doplňkového vlivu enzymů účastnících se lipidového metabolismu. Kromě FFAs IFABP váže nejspíš i ostatní ligandy jako jsou fenolické antioxidanty. IFABP se hojně nachází v enterocytech a představuje 2 – 3 % cytoplazmatické hmoty těchto buněk. Exprese jeho mRNA souvisí se zkonsumovanou stravou. Subjekty s alelou *Thr54* měly vyšší koncentraci FFA než homozygoti pro alelu *Ala54*, pokud konzumovaly stravu bohatou na

nasyčené mastné kyseliny (saturated fatty acid; SFA). Hypotéza Baiera a kol. (Baier, 1995) navrhuje přijatelný mechanismus pro interakci mezi polymorfizmem *Ala54/Thr54* genu *FABP2* a stravou a určení citlivosti na inzulín. Přítomnost polymorfizmu *Ala54/Thr54* genu *FABP2* tudíž zhoršuje citlivost inzulínu na periférii, jestliže jeho nositelé konzumují stravu bohatou na SFA.

Tabulka 5: Souhrn výsledků interakcí geny-strava v rozvoji diabetu typu 2 (Dedoussis, 2007)

Studie	Polymorfizmus	Závěr
Memisoglu, 2003	<i>PPARG Pro12Ala</i>	Genotyp <i>PPARG Pro12Ala</i> modifikoval interakci mezi celkovým příjmem tuků ve stravě a rizikem vzniku obezity. U homozygotů <i>Pro/Pro</i> byl nejvyšší kvintil celkového příjmu tuku spojen se zvýšeným rizikem obezity.
Soringer, 2006	<i>PPARG Pro12Ala</i>	Subjekty s alelou <i>Ala-12 PPARG</i> měly nižší riziko vzniku diabetu typu 2. Mezi příjmem MUFA a polymorfizmem <i>PPARG2 Pro12Ala</i> se vyskytuje interakce. Obézní pacienti s alelou <i>Ala-12</i> měli vyšší HOMA-IR (OR = 4,8; CI = 1,3-18,2).
Corella, 2006	<i>PLIN 11482GA, 14995AT</i>	Mezi příjmem tuků, sacharidů a polymorfizmy <i>11482GA</i> a <i>14995AT</i> v genu <i>PLIN</i> byla nalezena významná interakce geny-strava.
Perez-Martinez, 2005	<i>SCARB1</i> exon 1, <i>rs4238001</i>	U subjektů nesoucích alelu <i>A</i> v exonu 1 lokusu genu <i>SCARB1</i> byla nalezena spojitost se zvýšenou citlivostí na inzulín po stravě bohaté na MUFA.
Marin, 2005	<i>FABP2 Ala54Thr</i>	Při konzumaci stravy bohaté na nasycené mastné kyseliny byla u subjektů nesoucích alelu <i>Thr54</i> zaznamenána vyšší koncentrace volných mastných kyselin než u homozygotů pro alelu <i>Ala54</i> .

Vysvětlení: Mononenasyčená mastná kyselina (monounsaturated fatty acid; MUFA), homeostatický model inzulínové rezistence (homeostasis model assessment of insulin resistance; HOMA-IR), relativní riziko (odds ratio; OR), interval spolehlivosti (confidence interval, CI).

6.1.7 Předcházení komplikacím diabetu pomocí správné stravy

Důležitost prevence diabetu u jedinců s vysokým rizikem je zdůrazněna v posledních letech díky značné a celosvětové prevalenci tohoto onemocnění. Genetická náchylnost hraje u určitých skupin lidí ve výskytu diabetu typu 2 významnou roli. Genetická výbava populace se však mění poměrně pomalu, a proto současná „epidemie“ odráží spíše výrazné změny v životním stylu. Tyto změny, které jsou charakterizovány sníženou fyzickou aktivitou a zvýšeným příjmem energie, vedou ke vzniku obezity, což je silný rizikový faktor pro diabetes. Diabetes mellitus druhého typu je ovlivněn jak geny, tak chováním jedince.

Navzdory složitosti dlouhodobého udržení redukované tělesné hmotnosti, několik studií ukazuje, že přiměřené udržení úbytku hmotnosti je důležité, aby se významně snížilo riziko vzniku diabetu typu 2. Redukovaný příjem celkového tuku, obzvláště nasycených tuků, má snižovat riziko diabetu. Zvýšený výskyt diabetu je spojen se zvýšeným příjmem tuků v potravě a závisí i na celkovém množství kalorií, ačkoli tento účinek není prokázán ve všech studiích. Důležitost vyváženého poměru ω -6 a ω -3 mastných kyselin byla zkoumána v lyonské studii (the Lyon Heart Study; *Simopoulos, 1999*). Jedná se o prospektivní, randomizovanou, jednoduše zaslepenou studii sekundární prevence, která srovnává vlivy modifikované středozevní stravy, která je bohatá na kyselinu α -linolenovou (alpha-linolenic acid; ALA; poměr ω -6/ ω -3 je 4:1), obsahuje málo nasycených tuků, velmi málo trans mastných kyselin a hodně vitamínů C a E.

Dále bylo vysledováno, že strava založená na olivovém oleji oproti stravě s obsahem SFA nebo PUFA má u zdravých jedinců pozitivní účinky na aterogenní faktory spojené se zánětlivým procesem v cévní stěně, tzn. na chemotaxi monocytů a jejich adhezi na endoteliální buňky a expresi adhezivních molekul. V tomto ohledu léčba kyselinou olejovou ochránila endoteliální buňky proti nadměrné expresi molekul, jejichž adheze je indukovaná cytosinem. (*Dedoussis, 2007*)

6.2 Polymorfismus *SstI* genu pro apolipoprotein C-III určuje odpověď inzulinu na oGTT po konzumaci stravy bohaté na nasycené tuky

Obezita, diabetes typu 2 a vysoký krevní tlak jsou běžné v západní populaci. Tyto tři faktory spolu s nízkou koncentrací HDL, hypertriglyceridemií a hyperinzulinémií byly označeny některými autory jako tzv. syndrom inzulinové rezistence. Jedním z mechanismů podílejícím se na rozvoji tohoto syndromu je buněčný defekt, který zmenšuje využití glukózy zprostředkované inzulinem. Syndrom je jasně spojen se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění. Vznik inzulinové rezistence nezávisí jen na faktorech vnějšího prostředí, včetně stravy, ale i na interindividuální rozdílnosti, která má pravděpodobně genetický původ.

Apolipoprotein (apo) C-III je nezbytnou složkou částic bohatých na triacylglycerol (chylomikrony a very low-density lipoprotein; VLDL). Jeho hlavní role tkví v inhibici hydrolýzy těchto částic pomocí lipoproteinové lipázy a v inhibici játry zprostředkovaném příjmu apo E.

V genu, který kóduje apo C-III, se nachází polymorfismus určený restriční endonukleázou *SstI*. Tato mutace zahrnuje substituci guaninu cytosinem v 39. regionu tohoto genu. U bělošské populace se frekvence exprese zřídka se vyskytující alely *S2* pohybuje mezi 0,08 až 0,21. Několik autorů spojilo přítomnost této alely s vyšší postprandiální lipidovou odpovědí a vysokou koncentrací triacylglycerolu, ačkoli tato spojitost se neobjevuje vždy. Transgenní myši obsahující lidský gen pro apo C-III měly zvýšenou koncentraci triacylglycerolu. Polymorfismus *SstI* apo C-III je také spojován s hypertenzí a zvýšeným rizikem ischemické kardiopatie. Vzhledem ke vztahu mezi hypertriglyceridémií, hypertenzí, zvýšeným rizikem srdečního onemocnění a syndromem inzulinové rezistence bylo cílem této práce studovat asociaci mezi tímto polymorfismem a sacharidovým metabolismem u zdravých jedinců a následně studovat, zda tento polymorfismus stanovuje účinky stravy na sacharidový metabolismus.

6.2.1 Při stravě bohaté na SFA a v přítomnosti alely S2 koncentrace inzulínu po oGTT stoupá

Při rozvoji inzulínové rezistence hraje důležitou roli několik exogenních faktorů, a to především strava, ačkoli se nyní uvažuje o tom, že vliv má hlavně geneticky určená individuální variabilita. Nejzajímavější závěr v této studii představuje fakt, že alela S2 genu pro apo C-III určuje inzulínovou odpověď na oGTT poté, co studované subjekty přijímaly stravu bohatou na SFA nezávisle na BMI.

Studováno bylo 41 mužů, kteří dostávali tři různé typy diet. První byla bohatá na SFA [obsahovala 15 % proteinů, 47 % sacharidů a 38 % tuků (20 % nasycených)], druhou tvořil první krok programu National Cholesterol Education Program (NCEP-1) [obsahovala 15 % proteinů, 57 % sacharidů, 28 % tuků (< 10 % nasycených)] a třetí dieta byla bohatá na MUFA [15 % proteinů, 47 % sacharidů, 38 % tuků (22 % MUFA, < 10 % nasycených)]. Po ukončení jednotlivých dietních period podstoupili jedinci oGTT.

Někteří autoři uvedli, že vysoká koncentrace inzulínu při oGTT odráží stav inzulínové rezistence. V nynější studii je ukázáno, jak tento ukazatel vzrostl po podávání stravy bohaté na SFA ve srovnání se dvěma dalšími typy stravy. Tyto výsledky souhlasí se závěry studie Parkera a kol. (*Parker, 1993*), kteří ukázali, že strava bohatá na nasycené tuky nezávisle předznamenává inzuliněmii nalačno a koncentraci inzulínu po podání glukózy. Někteří autoři předpokládají, že zúčastněný mechanismus by mohl zvětšovat či zmenšovat afinitu inzulínu k jeho receptorům, a to z důvodu změn ve stavbě fosfolipidů buněčných membrán. Možnost postreceptorových metabolických změn však nemůže být vyloučena. Na druhé straně významně nižší bazální koncentrace glukózy a inzulínu při stravě bohaté na MUFA (srovnáno s NCEP-1) potvrzuje výsledky studií provedených na osobách s diabetem typu 1 a na zdravých jedincích. Dříve bylo ukázáno, jak strava bohatá na MUFA (středozevní strava) vedla u mladých zdravých mužů ke snížení krevního tlaku v porovnání s NCEP-1. Tento pokles pozitivně koreloval se sníženou koncentrací inzulínu v plazmě.

Polymorfismus genu pro apo C-III měl zřetelný vliv na koncentraci inzulínu po oGTT nezávisle na vlivu stravy během stravovací periody s vysokým obsahem SFA. Zvýšená koncentrace inzulínu po oGTT předpokládá, že tito jedinci byli ve stavu inzulínové rezistence.

Několik autorů spojuje alelu *S2* s vysokou koncentrací triacylglycerolu, se zvýšeným krevním tlakem a zvýšeným rizikem choroby koronárních cév. Srdeční choroby jsou rovněž více obvyklé u osob s diabetem typu 2, kteří jsou nositeli této alely. Dále bylo dokázáno, že alela *S2* je spojena nejen s vysokým krevním tlakem, ale také nezávisle toto onemocnění předznamenává. Mechanismus, kterým tento polymorfismus reguluje citlivost na inzulín, není znám. Alela *S2* je v nerovnováze s dvěma polymorfizmy umístěnými v promotorové oblasti genu pro apo C-III. Přítomnost těchto dvou mutací určuje chybění regulace poklesu apo C-III, který je fyziologicky produkován inzulínem, a vede k vzestupu plasmatické koncentrace apo C-III. Tento mechanismus by do značné míry vysvětlil vyšší koncentraci triacylglycerolu zaznamenanou v některých studiích u nositelů alely *S2*, protože nadměrná exprese apo C-III by vedla ke zvýšené inhibici lipoproteinové lipázy a snížení jaterního příjmu chylomikronových zbytků a VLDL zprostředkovaného apo E. Někteří vědci věří, že přítomnost vyšších koncentrací cirkulujících triacylglycerolů by mohla vést k inzulínové rezistenci. Zvětšené množství cirkulujících VLDL částic, které obsahují hodně triacylglycerolů, by také mohlo zvyšovat plasmatické koncentrace mastných kyselin nasycením odstraňujících mechanismů na periférii, a tudíž by mohlo přispět k vytvoření stavu inzulínové rezistence. Randle a kol. (*Randle, 1963*) před třiceti lety popsali, že ve svalech soutěží mastné kyseliny s glukózou jako zdroj energie. V játrech se pak s nárůstem dostupných mastných kyselin zvyšuje i glukoneogeneze. Oba tyto jevy vedou ke kompenzační hyperinzulinémii.

Zdá se, že BMI je nezávislým prediktorem koncentrace inzulínu po zatížení glukózou a nárůstu koncentrace inzulínu po všech 3 dietách. Obezita viscerální a obezita mužského typu jsou zřetelně spojeny s rozvojem inzulínové rezistence. Někteří autoři ukazují, že glukózový metabolismus zprostředkovaný inzulínem klesá o 30 – 40 %, když jsou subjekty více než 40 % nad svoji ideální tělesnou hmotností. Data z této studie potvrzují vliv BMI na ukazatele sacharidového metabolismu studované zde, ačkoli subjekty z této studie nebyly obézní (BMI < 30).

Závěrem lze říci, že konzumace diety bohaté na SFA u jedinců s alelou *S2* zvyšuje koncentraci inzulínu po oGTT, což může vést k nárůstu inzulínové rezistence. Tyto výsledky souhlasí se zvýšenou koncentrací triacylglycerolů a vysokým krevním tlakem, jak bylo pozorováno ve spojitosti s touto alelou. Na druhé straně z pohledu metabolismu sacharidů se zdá, že konzumace stravy s obsahem MUFA anebo NCEP-1 způsobují podobné zlepšení citlivosti na inzulín na rozdíl od stravy bohaté na SFA. (*Salas, 1998*)

7 Nutrigenomika, nutrigenetika a rakovinná onemocnění

7.1 Molekulární cíle pro bioaktivní komponenty stravy

7.1.1 Strava a spojitost s rakovinou - historie

Některé z nejprvotnějších popisů symptomů rakoviny zapsali ve svých zdravotnických záznamech již staří Číňané a Arabové. Jedním z prvních významných pokusů určit geografické rozložení tohoto onemocnění a možné příčiny a spojitosti se objevilo v 19. století ve střední Evropě. Je skličující, že některé stejné problémy přetrvávají již přes 200 let. Důkazy z různých zdrojů poukazují na to, že stravovací návyky jsou významným faktorem vnějšího prostředí v celém procesu vzniku rakoviny. Optimalizovaný příjem specifických potravin a/nebo jejich bioaktivních komponent se zdá být obezřetnou, neinvazivní a cenově přijatelnou strategií ke snížení rakovinové zátěže. Skutečnost však není tak jednoduchá. Komplexnost stravy společně s heterogenitou rakovinného procesu dělá vytvoření správných vzájemných vztahů velmi obtížným úkolem. Nicméně úspěch je klíčem k uspokojení jedince i celé společnosti.

7.1.2 Bioaktivní složky stravy

Zatímco epidemiologické a preklinické důkazy pokračují ve zdůrazňování složek stravy, které se dělí na makro- a mikronutrienty a pravděpodobně modifikují proces karcinogeneze, existuje v literatuře stále mnoho nejednotností. Ty mohou odrážet kumulativní efekty řady odlišností, které ovlivňují kvantitu účinku bioaktivních složek nacházejících se na cílovém místě nebo které ovlivňují schopnost způsobit změnu v metabolismu nebo genotypu.

Existují dosti přesvědčivé důkazy o tom, že řada živin interaguje se specifickými molekulárními cíly. Studie bez výjimky ukazují, že velké množství informací v těle je pozměněno přítomností nebo nepřítomností složek stravy. Pochopení dějů v buňkách, které umožňují celkové změny, zůstává nejasný. Nicméně, běžné děje jako stálost mRNA a polymorfizmy mohou pomoci vysvětlit množství sledovaných účinků. Základ pro pochopení více nutrigenomických efektů je důležitý, je ale rovněž zásadní porozumět tomu, že některé procesy jsou ovlivněny současně. Seskupování změn genové exprese a pak vyjádření z hlediska poměru s jiným procesem může být nejvíce informativní. Takový

přístup byl použit s jistým úspěchem při zkoumání změn v buněčné proliferaci a apoptóze. Další charakterizace těchto profilů se bude muset ještě zkoumat, především kvůli shodám a rozdílům v odpovědi na různé živiny a také proto, aby bylo možné potenciální shody a rozdíly identifikovat. (*Milner, 2004*)

7.2 Karcinogeneze a foláty

Nízká konzumace ovoce a zeleniny byla vždy spojována se zvýšeným rizikem rakoviny. Mnoho složek ovoce a zeleniny by mohlo zodpovídat za snížené riziko vzniku tohoto onemocnění. Mezi kandidátní složky patří zejména foláty. Velmi zjednodušeně se dá říci, že rakovina vzniká kvůli nadměrnému poškození DNA a/nebo nepřiměřené expresi kritických genů. Foláty jsou tudíž v popředí zájmu jako protektivní složka, protože hrají důležitou roli při syntéze nukleotidů a také při biologické methyloaci molekul jako jsou DNA, RNA, proteiny a fosfolipidy.

Epidemiologické studie vysledovaly, že snížený stav folátů je spojen s rakovinou děložního čípku, tlustého střeva, plic, jícnu, mozku, slinivky břišní a prsu. Nejpersvědčivější je tento vztah pro kolorektální karcinom. Nedostatek folátů je zároveň považován za důležitý faktor rektální karcinogeneze podpořené alkoholem, protože alkohol pozměňuje mnoha způsoby normální folátový metabolismus.

Ačkoli některé studie na zvířatech podporují epidemiologické pojetí, že příjem folátů ve stravě je protektivní proti určitým druhům rakoviny, závěry nejsou zcela shodné. Důvody pro tyto rozporuplné výsledky jsou kvůli několika faktorům zahrnujícím živočišný druh, typ nádoru, dobu, dávku a délku aplikace karcinogenu, stádium karcinogeneze a hladinu a formu folátů ve stravě.

Lidské intervenční studie uspořádané tak, aby určily, zda jednotlivec ve vysokém riziku rakoviny má toto riziko snížené pomocí vysokých dávek folátů, byly provedeny téměř výhradně na případech rakoviny děložního čípku a tlustého střeva. Studie rakoviny děložního čípku byly nejednotné, a ačkoli osm randomizovaných intervenčních studií provedených na kolorektálních neoplazmatech bylo velmi slibných, malá velikost studované populace a podstata endpointů zamezila vytvoření jednoznačných závěrů o efektivnosti suplementace. (*Choi, 2000*)

7.3 Foláty

Foláty poskytují jednouhlíkové jednotky potřebné pro syntézu purinu a thymidylátu a pro metylaci rozmanitých esenciálních biologických sloučenin, včetně fosfolipidů, proteinů, DNA a neurotransmiterů. V aktivovaném methylovém cyklu folát ve formě N^5 -methyltetrahydrofolátu poskytuje methylové skupiny potřebné k přeměně homocysteinu na methionin, který je pak konvertován na univerzální donor methylových skupin – *S*-adenosylmethionin. Ačkoli ostatní nutrienty (methionin, cholin, vitamin B₁₂) dodávají nebo přepravují methylové skupiny, pouze foláty umožňují produkci jednouhlíkových skupin de novo. Funkční důležitost folátů pro metylace in vivo byla prokázána v mnoha studiích osvětlujících vztah nepřímé úměry mezi příjmem folátů a hladinou homocysteinu v plazmě a tím i spojitost nebo možné riziko cévních onemocnění.

Zpráva Ramperstauda a kol. (*Ramperstaud, 2000*) ukazuje efekt nedostatku folátů na metylaci lymfocytární DNA u zdravých starších žen. Tato zpráva pomáhá dokumentovat novou funkci folátů, která má potencionálně důležité důsledky. Uvedená zjištění potvrzují a rozšiřují předchozí výzkum o fakt, že nedostatek folátů nebo nutrientů s methylovými skupinami ve stravě způsobuje hypomethylaci DNA jak u krys, tak u lidí. Ve studiích na lidech byla hypomethylace DNA pozorována s použitím testu in vitro, který měřil příjem [³H]methylových skupin z adenosylmethioninu na určité dinukleotidové CpG-sekvence DNA izolované z lymfocytů. Poněkud překvapivě se významná hypomethylace DNA objevila během mírného vyčerpání folátů bez klinických projevů nedostatku folátů. Hypomethylace lymfocytární DNA se objevila během sedmi- až devítitýdenní periody, což je také překvapivé, protože průměrná doba životnosti veškerých folátů těla byla stanovena pomocí kinetického modelu přibližně na 200 dní. Dynamika methylačních reakcí závislých na folátech je očividně mnohem citlivější na změny v příjmu folátů než přizpůsobení celkových zásob folátů v těle.

Mezi nejvýznamnější důsledky nových informací o folátech a metylaci DNA patří hypotetické mechanismy, které tvoří základ vztahů mezi foláty přijatými v potravě a karcinogenezí. Nejatraktivnější hypotéza se zaměřuje na roli methylace DNA jako reverzibilního signálu pro genovou expresi. Současný výzkum ukazuje, že methylace tlumí genovou expresi navozením acetylace histonů. Tato acetylace je zahrnuta v transkripční represi, která může být zmírněna demethylací DNA.

Důkazy o souvislostech mezi metylací DNA, genovou expresí a karcinogenezí jsou značné. Zahrnují obecné poznatky o genomické hypomethylaci DNA v nádorové tkáni a účinky místně specifického přizpůsobení methylace DNA na expresi protektivních enzymů, tumor supresorových proteinů a onkogenů.

Jelikož je methylace DNA silným supresorem genové exprese, sekundární adaptace v methylaci DNA na nedostatek folátů může ovlivňovat expresi onkogenů i tumorsupresorových genů.

U krys krmených před rozvojem jaterních nádorů potravou chudou na methylové skupiny se objevila hypomethylace DNA na specifických místech protoonkogenů *c-myc*, *c-fos* a *c-Ha-ras* společně se zvýšeným množstvím odpovídající mRNA. Ačkoli hypomethylace DNA může vést k nadměrné expresi onkogenů, jiné důkazy svědčí o tom, že inaktivace tumorsupresorových genů hypermethylací promotorových oblastí je u lidí též spojena s řadou neoplazmat a tumorů. U krys způsobil dlouhodobý nedostatek folátů nebo methylových skupin místně specifickou methylaci v genu *p53* spojenou se sníženým množstvím mRNA.

Ačkoli epidemiologické studie podporují inverzní spojitost mezi stavem folátů a rizikem rakoviny u lidí, výsledky z experimentálních zvířecích studií jsou nejednotné. V závislosti na době nutriční intervence a patofyziologickém stavu buněk může působit nedostatek folátů jako prokarcinogen i jako antikarcinogen. Např. sekundární poškození DNA při nedostatku folátů může vyvolat neoplastickou transformaci v normálních buňkách, ale stejným mechanismem může indukovat apoptózu a ústup tumoru v nádorových buňkách. Podobně suplementace folátů může být prevencí před neoplastickou transformací anebo působit jako promotor v nádorových buňkách. Ačkoli protikladné výsledky ze studií na zvířatech mohou být způsobeny rozdílnými podmínkami, je důležité poznamenat, že vliv dlouhodobého nedostatku folátů na model methylace DNA se liší podle stádia karcinogeneze indukovaním celkové hypomethylace v preneoplastických buňkách a regionální hypermethylace v nádorových buňkách. Takže je zřejmé, že důležité in vivo methylační agens jako je folát může mít rozdílné efekty na expresi genů spojených s karcinogenezí a je tedy nutné mít mnohem více informací, aby bylo možné definovat specifickou roli a rozmezí koncentrací folátů potřebné v různých stádiích karcinogeneze.

Methylace DNA může také ovlivnit karcinogenezi působením na opravu DNA a stabilitu chromozómů. Promotorová oblast genu *hMLH1* opravujícího špatná spojení je opakovaně hypermethylována a utlumena v případě roztroušeného kolorektálního karcinomu. Ostatní důkazy uvádějí, že funkce *hMLH1* v několika buněčných liniích je spojena s metylačními vzory několika buněčných genů. Methylace DNA reguluje genovou expresi prostřednictvím reverzibilní adaptace acetylace histonů, která má vliv na strukturu chromatinu a přístupnost transkripčních faktorů k jejich vazebným místům. Methylace DNA tedy hraje důležitou roli a stav folátů a vitamínu B₁₂ v lidském těle ovlivňuje křehkost DNA a chromozómů. Studie o suplementaci folátů a vitamínu B₁₂ (*Fenech, 1998*) ukazuje vzájemný vztah mezi markery poškození lymfocytárních chromozómů a množstvím vitamínu B₁₂ (nepřímo úměrný) a homocysteinu (přímo úměrný) v plazmě. V této studii nebyla pozorována žádná souvislost mezi poškozením chromozómů a foláty nebo methylací DNA, avšak subjekty neměly nedostatek folátů ani nedostávaly stravu s nízkým obsahem folátů.

Současná identifikace mnoha genových polymorfizmů souvisejících s procesem methylace a důležitá role folátů, vitamínu B₁₂ a methioninu v těchto procesech naznačuje, že mnoho komplexních interakcí genů a prostředí může ovlivňovat methylaci DNA, genovou expresi a rozličnost klinických výstupů. (*Jacob, 2000*)

7.4 Kyselina listová – vitamín a všelék nebo genetická časovaná bomba?

7.4.1 Foláty – nutriční všelék

Pochopení, jak může výživa ovlivnit základní životní procesy, v posledních letech značně pokročilo. Jedním z nejlepších příkladů je kyselina listová. Vědci z různých oborů od výživy po molekulární biologii studují roli tohoto vitamínu v rozvoji chorob. Důležitost folátového nutričního statusu a/nebo genetiky je spojena s přemírou různých onemocnění, včetně poruch nálady nebo Alzheimerovy choroby, a s řadou druhů rakoviny - rakoviny tlustého střeva, prsu, slinivky, děložního čípku, bronchů a leukémie. Dále je zahrnut i v etiologii cévních onemocnění, novorozeneckých defektů, Downova syndromu, těhotenských komplikací a mužské neplodnosti. Ačkoli foláty a/nebo jejich související geny hrají důležitou roli v těchto onemocněních, musí se pamatovat na to, že v jakémkoli

klinickém fenotypu je neustále zahrnuta komplexní sada interakcí gen-gen a nutriet-gen a že varianta *677T MTHFR* a nízká hladina folátů samy nezpůsobí tato onemocnění.

Důvod pro tuto paletu účinků je založen na několika molekulárních mechanismech citlivých na vitamíny skupiny B, které slouží genomickému aparátu. Buněčný status folátů a/nebo interakce mezi příjmem folátů a polymorfizmy enzymů závislých na folátech by mohly být podstatným činitelem těch mechanismů, které zahrnují udržování genomických vzorů CpG-methylace pro regulovanou genovou expresi a syntézu pyrimidinových nukleotidů k tomu, aby se předešlo špatnému začlenění uracylu a následné nestabilitě DNA.

Třetí mechanismus, který se netýká epigenetického fenoménu, uvádí foláty do souvislosti s atero- a trombogenními cévními chorobami – foláty a enzymy na nich závislé jsou rozhodující pro snižování hladiny homocysteinu v plazmě. Homocystein je sirná aminokyselina toxická pro cévy, a proto je přeměněna na methionin methyltetrahydrofolátem. Jestliže je tato forma folátu v nedostatečném množství, hladina homocysteinu stoupá, což vede k riziku vzniku vaskulární patologie.

7.4.2 Genetická selekce a příjem folátů v potravě

Navzdory řadě prověřených benefitů potravy bohaté na foláty ukazují současná zjištění, že vystavení zvýšeným hladinám tohoto vitamínu během perikoncepční periody by mohlo selektovat embrya, která nesou mutaci alely *677T MTHFR*. Naproti tomu při nízkých zásobách folátů je tato alela spojena se vzrůstající hladinou homocysteinu a nenormálními epigenetickými poruchami. Oba pochody jsou klíčovými faktory vzniku vaskulárních chorob a rakoviny.

Dostatečné důkazy nyní podporují názor, že vysoký příjem folátů v populaci nebo neregulované libovolné užívání může zvýšit zastoupení alely *677T* a potencionálně ovlivnit prevalenci chronických degenerativních chorob s možným vlivem na morbiditu a mortalitu budoucích generací. (*Lucock, 2005*)

7.5 Přeměna kyseliny 5-formyltetrahydrolistové na 5-methyltetrahydrolistovou je porušená u homozygotů pro C677T v MTHFR

Vzácné dědičné defekty v MTHFR vedou k hyperhomocysteinémii a nízké hladině methioninu v plazmě. Klinické manifestace těchto vad se liší v rozmezí od neurologických poruch až po poruchy cévní. Závažnost takových abnormalit potom koreluje se stupněm ztráty aktivity enzymu.

V roce 1988 vědci poprvé identifikovali běžnou variaci enzymu MTHFR charakteristickou poklesem enzymové aktivity (~ 50 %) a větší citlivostí na tepelnou inaktivaci v porovnání s normálním enzymem *in vitro* (Kang, 1988). Když extrakt lymfocytů nebo fibroblastů obsahující tuto variaci enzymu byl předinkubován na 46 °C po dobu 5 minut, zbytková enzymová aktivita byla o hodně nižší než u normálního enzymu. Proto byla tato variace nazvána „termolabilní MTHFR“.

Po izolaci lidské cDNA pro MTHFR bylo zjištěno, že charakter termolabilního enzymu je kvůli homozygotní tranzici cytosinu za thymidin v nukleotidu 677 (C677T), která vede k substituci alaninu za valin.

Do dnešního dne byla aktivita termolabilní MTHFR popsána pouze *in vitro*. Smyslem studie proto bylo určit, zda přítomnost daného polymorfizmu narušuje syntézu kyseliny 5-methyltetrahydrolistové *in vivo*. U lidských subjektů s genotypem *MTHFR T/T* (mutantní) nebo *C/C* (wild-type) se měřil vzestup koncentrace této kyseliny v plazmě a v moči po orálním podání 5-formyltetrahydrolistové kyseliny. Postup byl založen na předchozích studiích, které dokázaly, že vzestup kyseliny 5-methyltetrahydrolistové v plazmě a v moči následuje po konverzi kyseliny 5-formyltetrahydrolistové na 5-methyltetrahydrolistovou a tento proces vyžaduje působení MTHFR.

7.5.1 Hodnocení aktivity jednotlivých genotypů MTHFR

Ve studii byla měřena schopnost homozygotních jedinců s genotypy *C677T MTHFR T/T* a *C/C* konvertovat kyselinu 5-formyltetrahydrolistovou na 5-methyltetrahydrolistovou. Tato konverze byla posouzena podle vzestupu koncentrace kyseliny 5-methyltetrahydrolistové v plazmě a v moči po orální dávce 5 mg

5-formyltetrahydrolistové kyseliny. Studie Whiteheada a kol. (*Whitehead, 1972*) ukázala, že příjem kyseliny 5-formyltetrahydrolistové (2 mg) je spojen s okamžitým vzestupem koncentrace kyseliny 5-methyltetrahydrolistové v portální a periferní krvi. Skutečnost, že tento vzestup byl pozorován v portální krvi, tj. předtím, než se podaný folát dostal do jater, je důkazem, že střevní tkáň má schopnost konvertovat kyselinu 5-formyltetrahydrolistovou na 5-methyltetrahydrolistovou.

V další studii Nixon a Bertino (*Nixon, 1972*) použili radioaktivně značenou 5-formyltetrahydrolistovou kyselinu, aby ukázali, že příjem tohoto folátu je spojen s okamžitým vznikem radioaktivity v periferní plazmě, což odpovídá množství přijaté 5-formyltetrahydrolistové kyseliny a skládá se z 90-ti % z této značené kyseliny. Tato data ukazují, že v průběhu absorpce nastává ztráta formylových skupin a následný přírůstek nových jednouhlíkových jednotek, které se pak redukují na 5-methylderivát. Studie také ukazuje, že po příjmu radioaktivně značeného 5-formyltetrahydrofolátu je exkrece folátu v moči charakterizována počátečním vzestupem koncentrace 5-formyltetrahydrofolátu a dále vzestupem koncentrace 5-methyltetrahydrolistové kyseliny, což odpovídá hladinám v plazmě.

Data z této studie neukazují žádný rozdíl mezi genotypy *MTHFR C/C* a *T/T* ve vzestupu koncentrace 5-methyltetrahydrolistové kyseliny v plazmě a v moči po orálním podání 5-formyltetrahydrolistové kyseliny. Nepřítomnost rozdílu mezi genotypy naznačuje, že aktivita mutantní varianty *MTHFR* byla při daných podmínkách natolik dostačující, že zabránila pozorování jakéhokoliv poklesu 5-methyltetrahydrolistové kyseliny. K interpretaci těchto výsledků může být použito několik vysvětlení.

Jednou z možností je, že varianta *T/T MTHFR* byla chráněna před inaktivací v přítomnosti dostatečné koncentrace folátových substrátů. Taková interpretace byla odvozena od důkazů, že množství celkového homocysteinu v plazmě u lidí s *T/T* genotypem *MTHFR* je zvýšeno pouze u těch jedinců, kteří mají nízký folátový status. Pokud je folátový status dostatečný, celková hladina homocysteinu se neliší od jedinců s wild-type genotypem. Jelikož je homocystein substrátem pro metylaci 5-methyltetrahydrolistovou kyselinou, jeho hladina v plazmě u jedinců s *T/T* genotypem *MTHFR* slouží k indikaci, zda je varianta *T/T MTHFR* schopná zvládnout buněčné požadavky pro 5-methyltetrahydrolistovou kyselinu. Tudíž, když je hladina homocysteinu v plazmě pro tranzici *C677T MTHFR* vyšší než u kontrolních subjektů s wild-type genotypem, je to nejpravděpodobněji kvůli defektu aktivity termolabilního enzymu. V této

studii měly všechny subjekty adekvátní folátový status, jak bylo naměřeno z plazmy a z červených krvinek (red blood cells; RBC). I všechny koncentrace homocysteinu v krvi byly normální. Zda se bude míra konverze pozřené 5-formyltetrahydrolistové kyseliny na 5-methyltetrahydrolistovou kyselinu lišit u homozygotů pro tranzici *C677T* s neadekvátním folátovým statutem zůstává neobjasněné.

Jiné vysvětlení spočívá v tom, že dávka 5 mg byla neadekvátní (tj. příliš vysoká nebo příliš nízká), aby rozlišila mezi dvěma fenotypy *MTHFR*. Současná studie však ukázala, že v porovnání s wild-type enzymem aktivita varianty *T/T MTHFR* z extraktu lymfocytů zůstala snížena v rozmezí přidaného substrátu.

Je též možné, že exprese genotypu *T/T MTHFR* in vivo se liší v různých tkáních. Rovněž byla určena distribuce folátových forem v RBC. U jedinců s wild-type *MTHFR* obsahovaly RBC výhradně polyglutamát 5-methyltetrahydrolistové kyseliny. Avšak u většiny jedinců s variantou *T/T MTHFR* obsahovaly RBC kromě polyglutamátu 5-methyltetrahydrolistové kyseliny ještě formylovaný polyglutamát tetrahydrolistové kyseliny v poměru od 0 do 58 % celkového množství folátů. U všech subjektů byl celkový obsah folátů v RBC určen jako normální množství a nelišil se mezi genotypy.

Bez ohledu na folátový status se během zrání RBC proces, při kterém dochází ke konverzi folátů na 5-methyltetrahydrolistovou kyselinu pomocí *T/T* varianty *MTHFR*, stává oslabený. Studie, která je v rozporu s uvedeným tvrzením, naznačuje, že ve tkáních, které jsou odpovědné za konverzi pozřené 5-formyltetrahydrolistové kyseliny na kyselinu 5-methyltetrahydrolistovou (např. střevo a játra), *T/T MTHFR* neprojevuje oslabenou aktivitu. Možnost jednotlivých tkání odlišovat se v expresi *T/T MTHFR* in vivo je tedy třeba ještě prozkoumat. (*Stern, 2000*)

7.6 Polymorfismus genů účastnících se jednouhlíkového metabolismu a riziko rakoviny prsu

7.6.1 Metabolismus uhlíku a SNP účastnících se genů

Metabolismus uhlíku (viz Obrázek 2) je síť vzájemně propojených biologických reakcí, ve kterých je jednouhlíková složka převedena do skupiny sloučenin odvozených od folátu. Tak se usnadňuje propojení mezi syntézou DNA (genetika) a methylací DNA

(epigenetika), což jsou základní procesy v etiologii karcinomu prsu. Významná je produkce *S*-adenosylmethioninu, který je primárním donorem methylových skupin pro metylaci DNA, RNA i proteinů. Dále dodává methylové skupiny při metylaci deoxyuridinmonofosfátu na deoxythymidinmonofosfát při syntéze DNA.

Poruchy jednouhlíkového metabolismu mohou hrát významnou roli v rozvoji a růstu neoplasmů v důsledku účinku na genovou expresi prostřednictvím methylace DNA a v důsledku vlivu na integritu genomu pomocí syntézy a reparace DNA. Nedostatek folátů sám o sobě má dostatečnou sílu, aby zmenšil celkové zásoby methylových skupin. Epidemiologické studie podporují význam doplňování methylových skupin v patogenezi karcinomu prsu, ale výsledky nejsou vždy konzistentní. Některé velké prospektivní epidemiologické studie zjistily, že zvýšení příjmu kyseliny listové může chránit proti rakovině prsu, zvláště u lidí nadměrně konzumujících alkohol.

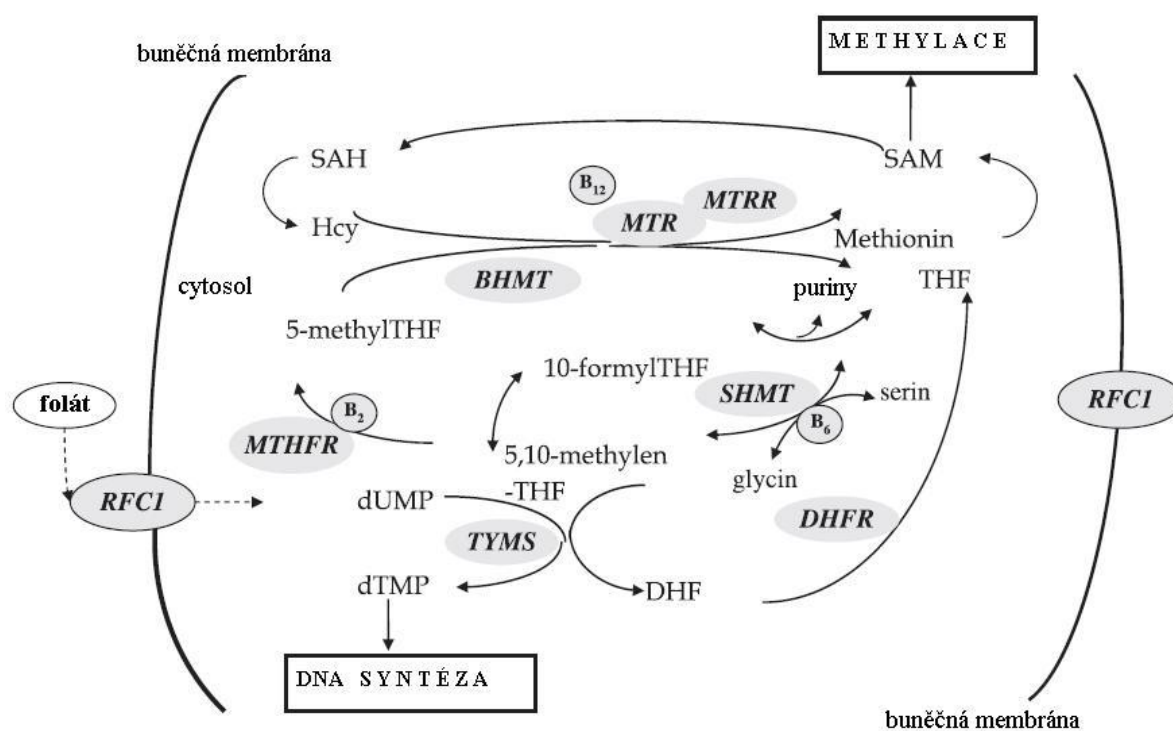
V nedávné metaanalýze třinácti studií typu případ – kontrola a 9 kohortových studií (Lewis, 2006) nebyla zjištěna žádná významná asociace mezi příjmem kyseliny listové a rizikem rakoviny prsu. Spornější informace přináší screeningová studie rakoviny prostaty, plic, tlustého střeva a vaječníků (Stolzenberg-Solomon, 2006), v níž bylo zvýšené riziko rakoviny prsu u postmenopauzálních žen spojeno se suplementací kyseliny listové v množství větším než 400 µg za den.

Fyziologické dávky methylových skupin mohou být určeny pomocí vzájemného působení prostředí a genetických faktorů. Dobrým kandidátem pro studium interakcí genů a prostředí je právě jednouhlíkový metabolismus. V populační studii případ – kontrola (the Long Island Breast Cancer Study Project; LIBCSP; Gammon, 2002) byl u pacientů, kteří neužívali žádnou suplementaci, nalezen inverzní vztah mezi příjmem vitamínu B a rizikem rakoviny prsu. Funkční polymorfismus $677C \rightarrow T$ v genu pro MTHFR, což je klíčový enzym jednouhlíkového metabolismu, byl samostatně spojen s rizikem vzniku rakoviny prsu. Mezi tímto polymorfizmem a příjmem folátů byla rovněž patrná významná interakce.

V této studii byla použita stejná populace jako v LIBCSP a systematicky se zkoumalo, zda je riziko rakoviny prsu spojené s funkčními polymorfizmy sedmi dalších klíčových genů zapojených do uhlíkového metabolismu. Tyto geny kódují následující enzymy: thymidylátsyntázu (thymidylate synthase; TYMS), methioninsyntázu (methionine synthase; MTR), methioninsyntázu-reduktázu (methionine synthase reductase; MTRR), cytosolovou serinhydroxymethyltransferázu (cytosolic serine hydroxymethyltransferase;

cSHMT), dihydrofolátreduktázu (dihydrofolate reductase; DHFR), betain-homocystein methyltransferázu (betaine-homocysteine methyltransferase; BHMT) a redukovany přenašeč folátů 1 (reduced folate carrier 1; RFC1) (Obrázek 2). Zároveň se zjišťovalo, zda tyto polymorfizmy interagují s přijatým vitamínem B ve stravě a zda je pak ovlivněno riziko rakoviny prsu.

Obrázek 2: Schematický obrázek metabolismu uhlíku. (Xu, 2007)



Klíčové geny účastníci se jednouhlíkového metabolismu zahrnují *MTHFR*, *TYMS*, *MTR*, *MTRR*, *cSHMT*, *DHFR* a *BHMT*.

Redukovaný přenašeč folátů 1 (reduced folate carrier 1; RFC1) po intestinální absorpci transportuje polyglutamylfolát ze stravy (převládající forma folátů ve stravě).

Uhlíkového metabolismu se dále účastní: homocystein (Hcy), S-adenosylmethionin (SAM), adenosylhomocystein (SAH), tetrahydrofolát (THF), dihydrofolát (DHF), deoxyuridin monofosfát (dUMP) a deoxythymidin monofosfát (dTMP).

7.6.2 Interakce genů souvisejících s uhlíkovým metabolismem

S rizikem vzniku rakoviny prsu souvisí dva polymorfizmy *MTHFR*. Polymorfizmy ostatních sedmi genů nemají významnou spojitost s onemocněním kromě náznaku vztahu dávka-odpověď u polymorfizmu *TYMS 5'-UTR*. Spojitost genotypu a rakoviny prsu se nelišila u pre- nebo postmenopauzálních žen.

Vědci zkoumali společný efekt genetických variací a konzumace folátů a vitamínů skupiny B na riziko vzniku onemocnění. S výjimkou již zmíněné významné interakce *MTHFR*-foláty nebyla jiná podstatná interakce genů a folátů pozorována. Jelikož vitamíny skupiny B jsou kofaktory *MTHFR*, *cSHMT* a *MTR*, byly také studovány potencionální interakce B₂-*MTHFR*, B₆-*cSHMT* a B₁₂-*MTR*. Žádné známky interakcí však nalezeny nebyly.

Vzhledem ke složitosti interakcí mezi geny (Obrázek 2) se sledovaly interakce mezi sousedícími geny v násobném měřítku, např. *MTHFR-TYMS*, *BHMT-MTR*, *MTRR-MTR*, *MTHFR-MTR* a *MTHFR-cSHMT*. Podstatná interakce byla zaznamenána pouze mezi *677C→T* v *MTHFR* a polymorfizmem tandemových repetitiv *TYMS 5'-UTR*. V porovnání s jedinci s wild-type genotypem na obou lokusech (*677CC-3R/3R*) bylo pro genotyp *MTHFR 677TT* kombinovaný s genotypy *TYMS 3R/3R* nebo *3R/2R* a stejně tak i genotyp *TYMS 2R/2R* kombinovaný s genotypy *MTHFR 677CC* nebo *TT* pozorováno značně zvýšené riziko.

7.6.3 Významná interakce *MTHFR* a *TYMS*

Rozdíly v genech pro enzymy podílející se na jednouhlíkovém metabolismu jsou vhodnými kandidáty pro studium efektů genetických i vlivů prostředí a jejich působení na riziko vzniku rakoviny prsu. Máme epidemiologické důkazy o tom, že riziko vzniku rakoviny prsu může být sníženo zvýšením příjmu folátů a příbuzných vitamínů skupiny B. V této studii jsou, jako v jedné z prvních, systematicky zhodnoceny genetické variace zapojené do jednouhlíkového metabolismu ve vztahu k riziku vzniku karcinomu prsu. Vzhledem k vysoké prevalenci těchto polymorfizmů v běžné populaci pomůžou výsledky studie identifikovat rizikové faktory pro prevenci onemocnění.

MTHFR je klíčový gen v jednouhlíkovém metabolismu. V kódující oblasti byly studovány dva nesynonymní polymorfizmy, *677C→T* a *1298A→C*. Jejich souvislost

s rizikem karcinomu prsu je ale rozporuplná. Informace o dalších polymorfizmech genů metabolismu uhlíku jsou poměrně vzácné a byly obecně negativní.

Co se týká genotypů *MTR*, *MTRR* nebo interakcí těchto genotypů s polymorfizmem *677C→T* v *MTHFR* se riziko vzniku rakoviny prsu statisticky nelišilo. Podobně nebyla nalezena žádná souvislost mezi polymorfizmem tandemových opakování *TYMS 5'-UTR* a rizikem rakoviny prsu. Mezi rizikem tohoto onemocnění a polymorfizmem *2756A→G* v *MTR* rovněž nebyl prokázán žádný vztah. Souvislost ostatních polymorfizmů účastnících se metabolismu uhlíku s uvažovaným rizikem rakoviny prsu také nalezena nebyla.

Až na významnou souvislost polymorfizmu *MTHFR* s rizikem vzniku karcinomu prsu, jak již bylo uvedeno výše, polymorfizmy v jiných genech pro biotransformaci uhlíku nijak výrazně toto riziko ve studované populaci samostatně nezměnily. Tyto výsledky tedy zdůrazňují především rozhodující úlohu *MTHFR*. Tento enzym katalyzuje ireverzibilní přeměnu 5,10-methyltetrahydrofolátu (hlavní formy intracelulární kyseliny listové) na 5-methyltetrahydrofolát (hlavní formu cirkulující kyseliny listové), což může být limitujícím krokem, protože 5,10-methyltetrahydrofolát je substrátem pro další tři enzymatické reakce, včetně reakce katalyzované *TYMS* (viz Obrázek 2).

Změny aktivity *MTHFR* mohou naklonit rovnováhu jednouhlíkového metabolismu ve prospěch syntézy DNA na úkor nabídky methylových skupin (tj. *S*-adenosylmethioninu) pro methylační reakce. Nedostatečná nabídka methylových skupin může vést k nenormální methylaci DNA, která je spojena se vznikem rakoviny prsu. Vzhledem k nedostatečné souvislosti jiných polymorfizmů s tímto onemocněním se předpokládá, že ačkoli jednouhlíkový metabolismus zahrnuje síť vzájemně propojených enzymů, existuje značný nadbytek *MTHFR* vystupující jako vrátný nebo limitující enzym pro celou metabolickou cestu. Související reakce v komplexu metabolismu uhlíku pravděpodobně kompenzují jakýkoli případný deficit jednoho enzymu.

Mezi *MTHFR* a *TYMS* byla pozorována významná interakce. Taková interakce je biologicky přijatelná, protože 5,10-methyltetrahydrofolát je substrátem pro oba enzymy a může být buď ireverzibilně převeden na 5-methyltetrahydrofolát methyltetrahydrofolátreduktázou nebo se podílet na syntéze thymidylátu katalyzované thymidylátsyntázou. První reakce určuje zásobu folátu k remethylaci homocysteinu na methionin, kdežto *TYMS* směřuje foláty k syntéze DNA, která je jediným de novo zdrojem thymidylátu pro syntézu DNA v buňce (Obrázek 2). Nicméně, vzor OR spojený

s kombinovanými genotypy nelze snadno vysvětlit. Vzhledem k tomu, že *MTHFR 677T* a *TYMS 2R* jsou zřejmě rizikové alely, lze při kombinaci genotypů *MTHFR 677TT* a *TYMS 2R/2R* očekávat nejvyšší riziko. Při kombinaci těchto genotypů bylo OR menší než se očekávalo, což může odrážet citlivou rovnováhu mezi reakcemi zprostředkovanými *MTHFR* a *TYMS*.

Výsledky potvrdily důkazy o významu role *MTHFR* v této metabolické cestě. Mezi *MTHFR 677C→T* a *TYMS 5'-UTR* byla nalezena významná interakce. *MTHFR* a *TYMS* jsou tedy dva hlavní limitující enzymy v této metabolické cestě.

Tyto výsledky podporují závěry získané prostřednictvím tradičních epidemiologických analýz. Zjištění také zdůrazňují důležitost jednováhlíkového metabolismu v etiologii karcinomu prsu. Ačkoli je tento metabolismus sítí vzájemně propojených enzymů, je třeba hodnotit limitující enzym a jeho interakce s prostředím a s geny podílejícími se na stejném metabolismu. (Xu, 2007)

8 Diskuse

Cílem mé diplomové práce bylo zhodnotit některé nutrigenetické a nutrigenomické aspekty u vybraných chronických onemocnění. Pozornost jsem zaměřila na obezitu, kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus druhého typu a rakovinu.

Nejprve jsem se zabývala interakcemi mezi nutrienty a geny obecně. Některé nutrienty mohou vystupovat jako aktivátory či inhibitory určitých receptorů v organismu a ovlivňovat tak genovou transkripci. To znamená, že interagují s geny přímo a aktuálně. Pokud tělo není vystaveno působení nutrientu, jeho vliv odezní. Na rozdíl od tohoto případu, mohou nutrienty ovlivňovat geny dlouhodobě, působením na genovou expresi. Nejvýznamnějším mechanismem tohoto typu je methylace DNA v promotorové oblasti genu. Methylace probíhá na tzv. CpG ostrůvkách. Methylové skupiny zde zabrání navázání buď aktivačních nebo inhibičních faktorů a tím je negativně nebo pozitivně ovlivněna exprese genu. Methylační skupiny některých nutrientů způsobí trvalou metylaci genů, která se dokonce přenáší i z generace na generaci. Další interakci mezi nutrienty a geny představují individuální odlišnosti v jednotlivých nukleotidech (SNP) každého jedince. Většina z těchto polymorfizmů nemá význam pro změnu genové exprese. Malá část z nich má však podstatný význam pro různé nutriční požadavky jedinců. Na základě analýzy SNP bude v budoucnu možné provádět praktická výživová doporučení. (Ziesel, 2007)

Cílem použití nutrigenetických a nutrigenomických metod je především na základě genotypu jedince identifikovat markery onemocnění a doporučit mu taková konkrétní dietní doporučení, aby se zabránilo vzniku či rozvoji onemocnění. Těchto metod lze využít v prevenci primární, sekundární i terciární. (Dwyer, 2006)

Konkrétním příkladem může být vytvoření dietních doporučení pro osoby s nadváhou nebo obezitou, jak uvádí ve své studii Arkadianos (Arkadianos, 2007). Většina lidí po dodržování obecné redukční diety sníží na určitou dobu svoji tělesnou hmotnost. Po čase však někteří jedinci získají ztracenou hmotu zpět. Pokud však pacienti dodržují dietu stanovenou dle genetického rozboru vybraných genů, hmotnost se nezvýší. Zároveň se zlepší i hladina glukózy v krvi nalačno. Na rozdíl od pacientů z kontrolní skupiny, kteří dodržovali běžnou nízkokalorickou dietu, dosáhli pacienti z nutrigeneticky testované skupiny dlouhodobé redukce tělesné hmotnosti a prediabetickým jedincům se vrátila hladina glukózy opět do normálního rozmezí. Při aplikaci „nutrigenetické“ diety pacienti vykazují lepší compliance k léčbě. Vyvážený příjem nutrientů dále vede ke snížení rizika

vzniku chronických onemocnění jako jsou diabetes, kardiovaskulární choroby a metabolický syndrom.

Predispozice ke znovuzískání ztracené hmotnosti po redukční dietě lze odhalit pomocí profilování genové exprese *RIPK3* a *RNF216* v PBMC (Goyenechea, 2009). Jedinci, kteří mají vyšší hladinu mRNA těchto genů, pravděpodobně získají ztracenou hmotnost zpět. Tento faktor by proto mohl sloužit jako biomarker pro hodnocení léčby obezity.

Nutrigenomické a nutrigenetické aspekty lze sledovat i v souvislosti s kardiovaskulárním onemocněním. Současný výzkum je zaměřen především na eliminaci či redukci rizikových faktorů spojených s tímto onemocněním. K tomu je třeba dostatek informací o interakcích genetických polymorfizmů a stravy a již zmíněném kardiovaskulárním riziku. Jedním z těchto významných SNP je polymorfismus apolipoproteinu A-I *APOA1* – *75G→A* a jeho interakce s příjmem PUFA. Výsledky provedených studií (Ordovas, 2006) ukazují, že u žen se vzácnější alelou *A* docházelo k poklesu LDL při zvýšeném příjmu PUFA a ke zvýšení hladiny HDL. U žen s genotypem *G/G* docházelo ke zvýšení hladiny HDL naopak při příjmu PUFA menším než 4 % energetického příjmu. Příjem PUFA souvisí ještě s polymorfizmem *PPARA Leu162Val* genu pro PPAR- α . Přítomnost méně časté alely *V162* u mužů je spojena se zřetelně vyšší sérovou koncentrací celkového cholesterolu, LDL, apo B a apo C-III než u mužů s alelou *L162*. U osob s alelou *V162* však koncentrace triacylglycerolů nalačno se zvýšeným příjmem PUFA značně poklesla. Na základě těchto zjištění by bylo možné vypracovat individuální nutriční doporučení. Pro rozhodnutí, zda příjem PUFA zvýšit či snížit, je však třeba ještě upřesnit řadu informací týkajících se mechanismu účinku PUFA.

Rizikovým faktorem kardiovaskulárního systému je bezpochyby ateroskleróza. Její vznik je podmíněn jednak vnějšími faktory a jednak faktory genetickými. Cílem výzkumu (Yamasaki, 2006) genetických faktorů bylo provést širokospektrý scanning SNP a analýzu a následnou identifikaci kandidátských genů. Ukázalo se, že jednotlivé polymorfizmy zkoumaných genů nemají významný vliv na IMT karotidy, jakožto surogátu koncového bodu kardiovaskulárních příhod. Mnohem důležitější však byly kombinace některých polymorfizmů, a to především kombinace genotypu *MTHFR 677 TT* a *LTA 252 GG* a kombinace genotypu *ACE DD* a *LTA 252 GG*.

Další podstatný rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění je nízká hladina HDL. Proto se vědci (Fisler, 2005) zabývali vlivem běžného polymorfismu $-514C \rightarrow T$ v LIPC promotorovém genu na hladiny HDL v souvislosti s příjmem tuků v potravě. Genotyp *TT* byl ve většině případů spojen s vyšší hladinou HDL. V souvislosti s množstvím konzumovaných tuků však výsledky nebyly jednotné a tedy replikovatelné. Proto je třeba provést ještě další výzkum s dostatečně velkým vzorkem osob.

Hladinu HDL ovlivňují i další genetické faktory. TNF- α pozměňuje lipidový metabolismus a expresi genů účastnících se metabolismu lipidů. Genetický polymorfismus TNF- α ovlivňuje účinek potravou přijímaných PUFA na jeho produkci v lidském organismu. SNP v pozici $-238G \rightarrow A$ snižuje míru transkripce a produkce cytokinů, zatímco SNP v pozici $-308G \rightarrow A$ oba jevy zvyšuje. Polymorfizmy TNF- α způsobují změny v produkci TNF- α dle příjmu PUFA v potravě, což následně moduluje zánětlivý stav buněk a ovlivňuje zpětný transport cholesterolu. Zvýšený příjem PUFA znamená vyšší hladinu HDL a apo A-I u jedinců s genotypem TNF- α spojeným s nižší produkcí TNF- α . ω -3 a ω -6 PUFA mají různé účinky na produkci TNF- α a na hladiny HDL (Fontaine-Bisson, 2007). Dosavadní poznatky je tedy důležité potvrdit v dalším výzkumu a objasnit přesný mechanismus účinku.

Nutrigenomické a nutrigenetické metody lze uplatňovat při zkoumání vzniku a rozvoje diabetu mellitu druhého typu. Toto onemocnění patří mezi celosvětově nejrozšířenější onemocnění a jeho výskyt neustále stoupá. Vzniká opět vlivem vnějších faktorů a na podkladě genetickém. Cílem nutrigenomiky a nutrigenetiky je objasnit interakce genomu a stravy, určit optimální dietu pro jednotlivce a vysvětlit, jak genetická výbava jedince odpovídá na stravu nebo jak souvisí odlišné fenotypy s rozdíly v buněčné nebo genetické odpovědi. K tomu slouží analýza kandidátských genů a jejich polymorfizmů. Mezi takové geny patří *KCNJ11*, který kóduje Kir6.2, *TCF7L2*, polymorfismus *Gly972Arg* v *IRS1*, polymorfismus *Gly1057Asp* v *IRS2*, polymorfismus *Trp64Arg* v genu kódujícím β_3 adrenergní receptor a $-308 G/A$ promotorová varianta v *TNF*.

Citlivost k inzulínu, inzulínovou sekreci, nebo vztah mezi oběma jevy mohou ovlivňovat genetické variace v genu pro kalpain-10. Několik variant genů *ABCC8* (kódující sulfonylmočovinný receptor, SUR1) a *KCNJ11* (kódující vnitřní draslíkový kanál, Kir6.2) souvisí s poruchou sekrece inzulínu a diabetem typu 2. Pravým vnitřním genem pro diabetes typu 2 je *TCF7L2*. Objasněním mechanismu, kterým vedou změny ve

funkci nebo regulaci tohoto transkripčního faktoru ke ztrátě výkonu β -buněk a/nebo citlivosti k inzulínu, bude možné poskytnout nový zásadní pohled na patogenezi onemocnění.

Významným vnímavým genem je *PPARG*, který kóduje PPAR γ vystupující jako transkripční faktor. Tichá substituce *C1431T* v šestém exonu *PPARG* je polymorfismus, který moduluje vliv *Pro12Ala* na sklon k diabetu typu 2, resp. má projektivní charakter proti mírné hyperglykemii nalačno a diabetu typu 2. Významná interakce byla též popsána mezi polymorfizmem *Leu162Val* v PPAR α a příjmem ω -6 PUFA. U osob s méně častou alelou *V162* je zvýšený příjem ω -6 PUFA spojen se značnou redukcí koncentrace triacylglycerolů.

Před rozvojem diabetu typu 2 chrání vysoká plazmatická koncentrace adiponektinu. Hladiny adiponektinu a citlivost na inzulín jsou ovlivněny dědičnými variacemi na lokusu *ACDC*.

Vznik diabetu typu 2 souvisí nejen se samotnými geny, ale i s interakcemi genů a některých složek stravy. Genotyp *PPARG Pro12Ala* modifikuje interakci mezi celkovým příjmem tuků ve stravě a rizikem vzniku obezity. U homozygotů *Pro/Pro* při vysokém příjmu tuků riziko obezity vzroste. Polymorfismus *Pro12Ala* genu pro PPAR γ 2 úzce souvisí s příjmem MUFA a s BMI. Obézní lidé s alelou *Ala-12* mají vyšší hodnoty HOMA-IR, obzvláště když je jejich příjem MUFA nízký. Interakce tučné stravy a nadměrné exprese genu *Rad* zhorší inzulínovou rezistenci ve svalech. Genetické variace v lokusu genu *PLIN (11482GA a 14995AT)* modulují účinky běžného tuku a sacharidů ze stravy na inzulínovou rezistenci. Současné poznatky ukazují, že přítomnost alely *A* v polymorfizmu *SCARB1* v exonu 1 je spojena se statisticky významným vzestupem citlivosti na inzulín po konzumaci stravy bohaté na MUFA v porovnání s jedinci s alelou *G/G*. Přítomnost polymorfizmu *Ala54/Thr54* genu *FABP2* zhoršuje citlivost inzulínu na periférii, jestliže jeho nositelé konzumují stravu bohatou na SFA.

Přiměřené udržení úbytku hmotnosti je důležité, aby se významně snížilo riziko vzniku diabetu typu 2. Redukovaný příjem celkového tuku, obzvláště nasycených tuků, snižuje riziko tohoto onemocnění. (*Dedoussis, 2007*)

Konzumace diety bohaté na SFA nezávisle na BMI u jedinců s alelou *S2* genu pro apo C-III zvyšuje koncentraci inzulínu po oGTT, což může vést k nárůstu inzulínové

rezistence. Tyto výsledky korelují se zvýšenou koncentrací triacylglycerolů a vysokým krevním tlakem. (Salas, 1998)

Některé složky stravy mají bioaktivní charakter a mohou ovlivňovat proces karcinogeneze. (Milner, 2005) Největší pozornost je zaměřena především na foláty, které mají protektivní charakter na DNA. Hrají důležitou roli při syntéze nukleotidů a při biologické methyloaci molekul jako jsou DNA, RNA, proteiny a fosfolipidy. (Choi, 2000) Foláty poskytují methylové skupiny potřebné k přeměně homocysteinu na methionin, který je pak konvertován na univerzální donor methylových skupin – *S*-adenosylmethionin. Methyloace DNA je silným supresorem genové exprese. Nedostatek folátů ve stravě způsobuje hypomethyloaci DNA, která může vést k nadměrné expresi onkogenů v normálních buňkách. Sekundární poškození DNA při nedostatku folátů však může indukovat apoptózu a ústup tumoru v buňkách nádorových. Z toho vyplývá, že nedostatek folátů může působit jako prokarcinogen i jako antikarcinogen.

Na druhé straně hypermethyloace promotorových oblastí tumorsupresorových genů po suplementaci folátů vede k jejich inaktivaci a předznamenává vznik tumoru anebo může suplementace folátů působit jako prevence před neoplastickou transformací.

Je tedy nutné mít mnohem více informací, aby bylo možné definovat specifickou roli a rozmezí koncentrací folátů potřebné v různých stádiích karcinogeneze. (Jacob, 2000)

V metabolismu folátů hraje klíčovou roli enzym MTHFR. Pozornost vědců je proto zaměřena především na genetické variace *MTHFR* a jejich vliv na různá onemocnění v souvislosti s příjmem folátů. MTHFR je enzym odpovědný za přeměnu kyseliny 5-formyltetrahydrolistové na 5-methyltetrahydrolistovou. Tato konverze je porušena u homozygotů pro $677C \rightarrow T$ v *MTHFR*. (Stern, 2000) Funkční polymorfismus $677C \rightarrow T$ v genu pro MTHFR byl samostatně spojen s rizikem vzniku rakoviny prsu. Mezi tímto polymorfizmem a příjmem folátů byla rovněž patrná významná interakce. Metabolizmu uhlíku, do kterého patří i přeměna folátů, se ale účastní více enzymů. Proto se zkoumalo, zda je riziko rakoviny spojeno i s polymorfizmy dalších sedmi klíčových genů pro příslušné enzymy. Žádná spojitost ale u jednotlivých genetických variací nalezena nebyla. Podstatná interakce však byla zaznamenána mezi $677C \rightarrow T$ v *MTHFR* a polymorfizmem tandemových repetitivních *TYMS* 5'-UTR. Pro genotyp *MTHFR* $677TT$ kombinovaný s genotypy *TYMS* $3R/3R$ nebo $3R/2R$ a stejně tak i genotyp *TYMS* $2R/2R$ kombinovaný s genotypy *MTHFR* $677CC$ nebo TT bylo pozorováno značně zvýšené riziko. (Xu, 2007)

9 Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo zhodnotit nutrigenomické a nutrigenetické aspekty u vybraných onemocnění. Na základě těchto dat by bylo možné vytvářet individualizovaná doporučení pro konkrétního pacienta.

Zaměřila jsem se na chronická onemocnění, jejichž výskyt v populaci neustále stoupá, tzn. obezita, kardiovaskulární choroby, diabetes mellitus druhého typu a rakovina. U jednotlivých patologií je nejprve třeba zjistit kandidátské geny, které souvisejí se vznikem onemocnění, poté určit jednotlivé polymorfizmy těchto genů a nakonec odhalit interakce genů a stravy. Na základě takových údajů je možné vytvářet výzkumem podložená individuální nutriční doporučení.

Screening genů podílejících se na jednotlivých onemocněních, resp. jejich mutací a polymorfizmů je finančně nákladná metoda, proto její začlenění do každodenní praxe zatím není běžné. Nicméně výzkum v této oblasti se mohutně rozvíjí.

Nejvíce prozkoumanými nutrienty jsou zatím PUFA (ω -3 a ω -6 polynenasycené mastné kyseliny) a foláty. ω -3 a ω -6 PUFA mají rozdílné efekty v lidském organismu. Je tedy nutné přesné mechanismy ještě odhalit. Příjem PUFA může modulovat genovou expresi několika enzymů účastnících se lipidového a sacharidového metabolismu. Příjem PUFA interaguje s polymorfizmem *APOA1* – $75G \rightarrow A$ a ovlivňuje hladinu HDL a s polymorfizmem *PPARA* *Leu162Val* a moduluje koncentraci triacylglycerolů. Tento fakt komplikuje poskytnutí nutričních doporučení založených na genotypu, protože příjmem PUFA jsou ovlivněny dva rizikové faktory kardiovaskulárního onemocnění – hladiny HDL a triacylglycerolů. Příjem PUFA dále moduluje produkci TNF- α v lidském organismu. Polymorfizmy TNF- α způsobují změny v produkci TNF- α dle příjmu PUFA v potravě, což následně ovlivňuje zánětlivý stav buněk a zpětný transport cholesterolu. Na základě těchto zjištění by bylo možné vypracovat individuální nutriční doporučení. Pro rozhodnutí, zda příjem PUFA zvýšit či snížit, je však třeba ještě upřesnit mechanismus účinku PUFA.

Folátový nutriční status a genetika jsou spojeny s různými druhy onemocnění - poruchy nálady, Alzheimerova choroba, rakovina tlustého střeva, prsu, slinivky, děložního čípku, bronchů, leukémie, cévní onemocnění, novorozenecké defekty, Downův syndrom, těhotenské komplikace, mužská neplodnost. Suplementace foláty však není vždy na místě. Foláty totiž mohou působit jako antikarcinogen i prokarcinogen. Proto je nutné provést

ještě dostatek experimentů, aby bylo možné stanovit vhodné rozmezí koncentrací suplementovaných folátů.

Ve své diplomové práci jsem zachytila pouze zlomek informací týkajících se nutrigenomiky a nutrigenetiky a spojitosti s chronickými chorobami. Z výše uvedeného je zřejmé, že tyto dva vědní obory mají před sebou perspektivní budoucnost. Největším přínosem bude jistě vytváření individualizovaných doporučení pro konkrétní pacienty na základě jejich genotypu a využití v klinické praxi. Postupně by pak mělo docházet ke snížení výskytu chronických onemocnění a příznivým působením na zdraví konkrétního pacienta bude možné dosáhnout zlepšení zdraví celé populace.

10 Souhrn

Vliv stravy na lidské zdraví je neoddiskutovatelný. Na každého z nás však mohou složky stravy působit jinak. Lidé mají téměř shodný genom, ale vyskytují se v něm drobné odchylky, které nás činí jedinečnými. Tato jedinečnost se projevuje mimo jiné v rozdílných odpovědích na určité nutrienty.

Otázky stravy, genů a interakcí mezi nimi řeší dva rozvíjející se vědní obory – nutrigenomika a nutrigenetika. Nutrigenomika se snaží určit vliv běžných složek stravy na genom a pokouší se nalézat spojitosti rozdílných fenotypů s odlišnostmi v biologickém systému na úrovni buněčné a genetické odpovědi. Nutrigenetika identifikuje a charakterizuje varianty genů, které souvisí s rozdílnými odpověďmi na nutrienty, a spojuje tyto varianty se stavem nemoci.

Vědecký výzkum je zaměřen především na chronická onemocnění, jako je obezita, kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus druhého typu a rakovina. Vznik těchto onemocnění je podmíněn jednak faktory vnějšího prostředí a jednak genotypem každého jedince. Nutrigenetika hledá kandidátské geny, jejichž polymorfizmy vedou ke vzniku daného onemocnění. Nutrigenomika se pokouší objasnit interakce těchto genů se složkami stravy.

Společným cílem obou disciplín je vytvořit individualizovaná doporučení pro konkrétního pacienta a zlepšit tak zdraví a předcházet nemocem pomocí vhodné stravy.

11 Abstract

The effect of nutrition to human health is undisputable. Certain dietary compounds can influence each of us in different ways. Although people have almost identical genome, there are imperceptible differences that make us unique. This uniqueness is shown in different responses to specific nutrients.

The matter of diet, genes and gen-diet interactions are solved by two developing scientific disciplines – nutrigenomics and nutrigenetics. Nutrigenomics aims to determine the influence of common dietary ingredients on the genome, and attempts to relate the resulting different phenotypes to differences in the cellular and genetic response of the biological system. Nutrigenetics identifies and characterizes gene variants associated with differential responses to nutrients, and relates these variants to disease states.

Scientific research is focused primarily on chronic diseases including obesity, cardiovascular diseases, diabetes mellitus type 2 and cancer. The onset of the diseases is caused by environmental factors on the one hand, and by individual's genotype on the other hand. Nutrigenetics searches for candidates' genes whose polymorphisms lead to disease onset. Nutrigenomics attempts to unravel the interaction between these genes and dietary compounds.

The common goal of both disciplines is to make personalized recommendations for a patient to ameliorate health and to prevent diseases with an appropriate diet.

12 Seznam tabulek

Tabulka 1: Geny a polymorfizmy testované v nutri-genetické skupině pacientů. (<i>Arkadianos, 2007</i>).....	19
Tabulka 2: Individualizovaná doporučení pro skupinu nutri-geneticky testovaných pacientů mimo základní diety. (<i>Arkadianos, 2007</i>).....	20
Tabulka 3: Změny v antropometrických a klinických parametrech u vybraných subjektů (n = 12), které podstoupily nízkokalorickou dietu, aby snížily svoji tělesnou hmotnost. (<i>Goyenechea, 2009</i>).....	25
Tabulka 4: Fenotypické charakteristiky před aplikací nutriční léčby (týden 0) a po ní (týden 8) a o 6 měsíců později (týden 32). (<i>Goyenechea, 2009</i>).....	26
Tabulka 5: Souhrn výsledků interakcí geny-strava v rozvoji diabetu typu 2 (<i>Dedoussis, 2007</i>).....	51

13 Seznam obrázků

Obrázek 1: Methylace DNA může utlumovat genovou expresi. (<i>Ziesel, 2007</i>)	11
Obrázek 2: Schématický obrázek metabolismu uhlíku. (<i>Xu, 2007</i>).....	66

14 Použité zkratky

zkratka	vysvětlení zkratk	český význam
BMI	body mass index	váhově-výškový index
HDL	high-density lipoprotein	lipoprotein o vysoké hustotě
HOMA-IR	homeostatic model assessment for insulin resistance	homeostatický model inzulínové rezistence
LCAT	lecithin:cholesterol acyltransferase	S-lecithin-cholesterolacyltransferáza
LCD	low-calorie diet	nízkokalorická dieta
LDL	low-density lipoprotein	lipoprotein o nízké hustotě
LIPC	hepatic lipase gene	gen pro jaterní lipázu
LPL	lipoprotein lipase	lipoproteinová lipáza
MTF 1	metalresponsive transcription factor 1	transkripční faktor 1 reagující s kovy
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase	5,10-methylenetetrahydrofolátreduktáza
NFκB	nuclear factor κB	transkripční faktor NFκB
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	periferní krevní mononukleární buňky
PEMT	phosphatidylethanolamine <i>N</i> -methyltransferase	fosfatidylethanolamin- <i>N</i> -methyltransferáza
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor	receptor aktivovaný peroxizomovými proliferátory
PUFA	polyunsaturated fatty acids	polynenasycené mastné kyseliny
RIPK3	receptor-interacting serinethreonine kinase 3	serin-threonin kináza 3 interagující s receptorem
SNP	single-nucleotide polymorphism	polymorfismus jediného nukleotidu
TNF	tumor necrosis factor	tumor nekrotizující faktor
FFA	free fatty acids	volné mastné kyseliny
SFA	saturated fatty acids	nasyčené mastné kyseliny

15 Použitá literatura

- Arkadianos I, Valdes AM, Marinos E, Florou A, Gill RD, Grimaldi KA. Improved weight management using genetic information to personalize a calorie controlled diet. *Nutrition Journal* 2007;6:29.
- Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC, Eads J, Paolisso G, Tataranni PA, Mochizuki H, Bennett PH, Bogardus C, Prochazka M. An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 1995;95:1281–1287.
- Bento JL, Palmer ND, Mychaleckyj JC, Lange LA, Langefeld CD, Rich SS, Freedman BI, Bowden DW. Association of protein tyrosine phosphatase 1B gene polymorphisms with type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53:3007–3012.
- Corella D, Qi L, Tai ES, Deurenberg-Yap M, Tan CE, Chew SK, Ordovas JM. Perilipin gene variation determines higher susceptibility to insulin resistance in Asian women when consuming a high-saturated fat, low-carbohydrate diet. *Diabetes Care* 2006;29:1313–1319.
- Dedoussis GVZ, Kaliora AC, Panagiotakos DB. Genes, Diet and Type 2 Diabetes Mellitus: A Review. *The Review of Diabetic Studies* 2007;4(1):13–24.
- Dwyer J. Starting down the right path: nutrition connections with chronic diseases of later life. *American Journal of Clinic Nutrition* 2006;83(suppl):415–420.
- Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, et al. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *The New England Journal of Medicine* 2004;350:29–37.
- Fenech M, Aitken C, Rinaldi J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage rate in young Australian adults. *Carcinogenesis* 1998;19:1163–1171.

- Ferguson LR. Dissecting the Nutrigenomics, Diabetes, and Gastrointestinal Disease Interface: From Risk Assessment to Health Intervention. *OMICS A Journal of Integrative Biology* 2008;12(4):237–244.
- Fisler JS, Warden CH. Dietary fat and genotype: toward individualized prescriptions for lifestyle changes. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81:1255–1256.
- Fontaine-Bisson B, Wolever TMS, Chiasson J, Rabasa-Lhoret R, Maheux P, Josse RG, Leiter LA, Rodger NV, Ryan EA, Connelly PW, Corey PN, El-Sohehy A. Genetic polymorphisms of tumor necrosis factor- α modify the association between dietary polyunsaturated fatty acids and fasting HDL-cholesterol and apo A-I concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition* 2007;86:768–774.
- Gammon MD, et al. The Long Island Breast Cancer Study Project: description of a multi-institutional collaboration to identify environmental risk factors for breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2002;74:235–254.
- Goyenechea E, Crujeiras AB, Abete I, Martinez JA. Expression of Two Inflammation-Related Genes (*RIPK3* and *RNF216*) in Mononuclear Cells Is Associated with Weight-Loss Regain in Obese Subjects. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics* 2009;2:78–84.
- Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 2006;38:320–323.
- Grimble R, Howell WM, O'Reilly G, et al. The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor alpha production. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002;76:454–459.

- Chamberlain JC, Hill D, Shenkin A. Dietary treatment of hypercholesterolaemia: lack of relationship between individual response and genetic variation at the lipase loci. The Fluvastatin Genotyping Group. *Annals of Clinical Biochemistry* 1998;35:427–431.
- Cheyssac C, Dina C, Lepretre F, Vasseur-Delannoy V, Dechaume A, Lobbens S, Balkau B, Ruiz J, Charpentier G, Pattou F, et al. EIF4A2 is a positional candidate gene at the 3q27 locus linked to type 2 diabetes in French families. *Diabetes* 2006;55:1171–1176.
- Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: An integrated scheme. *The Journal of Nutrition* 2000;130:129–132.
- Ilany J, Bilan PJ, Kapur S, Caldwell JS, Patti ME, Marette A, Kahn CR. Overexpression of Rad in muscle worsens diet-induced insulin resistance and glucose intolerance and lowers plasma triglyceride level. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 2006;103:4481–4486.
- Jacob RA. Folate, DNA methylation, and gene expression: factors of nature and nurture. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 72:903–904.
- Kang SS, Zhou J, Wonk PWK, Kowalisyn J, Strokaosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *The American Journal of Human Genetics* 1988;43:414–421.
- Ko YL, Hsu LA, Hsu KH, Ko YH, Lee YS. The interactive effects of hepatic lipase gene promoter polymorphisms with sex and obesity on high-density-lipoprotein cholesterol levels in Taiwanese-Chinese. *Atherosclerosis* 2004;172:135–142.
- Kopecky J, Flachs P, Bardova K, Brauner P, Prazak T, Sponarova J. Modulation of lipid metabolism by energy status of adipocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;967:88–101.

- Lewis SJ, et al. Meta-analyses of observational and genetic association studies of folate intakes or levels and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 2006;98:1607–1622.
- Lucock M, Yates Z. Folic acid - vitamin and panacea or genetic time bomb? *Nature reviews – Genetics* 2005;6:235–240.
- Marin C, Perez-Jimenez F, Gomez P, Delgado J, Paniagua JA, Lozano A, Cortes B, Jimenez-Gomez Y, Gomez MJ, Lopez-Miranda J. The Ala54Thr polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene is associated with a change in insulin sensitivity after a change in the type of dietary fat. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;82:196–200.
- Masson LF, McNeill G. The effect of genetic variation on the lipid response to dietary change: recent findings. *Current Opinion in Lipidology* 2005;16:61–67.
- Memisoglu A, Hu FB, Hankinson S, Manson J, De Vivo I, Willett WC, Hunter DJ. Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass. *Human Molecular Genetics* 2003;12:2923–2929.
- Milner JA. Molecular Targets for Bioactive Food Components. *The Journal of Nutrition* 2004;134:2492–2498.
- Mori Y, Otabe S, Dina C, Yasuda K, Populaire C, Lecoeur C, Vatin V, Durand E, Hara K, Okada T, et al. Genomewide search for type 2 diabetes in Japanese affected sibpairs confirms susceptibility genes on 3q, 15q, and 20q and identifies two new candidate loci on 7p and 11p. *Diabetes* 2002;51:1247–1255.
- Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *The FASEB Journal* 2005;19:1602–1616.
- Nixon PF, Bertino JR. Effective absorption and utilization of oral formyltetrahydrofolate in man. *The New England Journal of Medicine* 1972;286:175–179.

- Ordovas JM. Genetic interactions with diet influence the risk of cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 2006;83(suppl):443–446.
- Ordovas JM, Corella D, Demissie S, et al. Dietary fat intake determines the effect of a common polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on high-density lipoprotein metabolism: evidence of a strong dose effect in this gene-nutrient interaction in the Framingham Study. *Circulation* 2002;106:2315–2321.
- Parker DR, Weiss ST, Troisi R, Cassano PA, Vokonas PS, Landsberg L. Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations: the Normative Aging Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 1993;58:129–136.
- Perez-Martinez P, Perez-Jimenez F, Bellido C, Ordovas JM, Moreno JA, Marin C, Gomez P, Delgado-Lista J, Fuentes F, Lopez-Miranda J. A polymorphism exon 1 variant at the locus of the scavenger receptor class B type I (SCARB1) gene is associated with differences in insulin sensitivity in healthy people during the consumption of an olive oil-rich diet. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005;90:2297–2300.
- Rampersaud GC, Kauwell GPA, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000;72:998–1003.
- Randle PJ, Garland PB, Hales EA, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963;1:785–789.
- Redden DT, Allison DB. Nonreplication in genetic association studies of obesity and diabetes research. *The Journal of Nutrition* 2003;133:3323–3326.

- Renz H, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gemsa D. Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E₂ and cyclic nucleotides. *The Journal of Immunology* 1988;141:2388–2393.
- Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000;405:847–856.
- Roche HM. Nutrigenomics - New approaches for human nutrition research. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006;86(8):1156–1163.
- Salas J, Jansen S, López-Miranda J, Ordovás JM, Castro P, Marín C, Ostos MA, Bravo MD, Jiménez-Perepérez J, Blanco A, López-Segura F, Pérez-Jiménez F. The *SstI* polymorphism of the apolipoprotein C-III gene determines the insulin response to an oral-glucose-tolerance test after consumption of a diet rich in saturated fats. *American Journal of Clinical Nutrition* 1998;68:396–401.
- Simopoulos AP. Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1999;60(5-6):421–429.
- Stolzenberg-Solomon RZ, et al. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *American Journal of Clinical Nutrition* 2006;83:895–904.
- Soriguer F, Morcillo S, Cardona F, Rojo-Martinez G, de la Cruz Almaraz M, Ruiz de Adana Mde L, Oliveira G, Tinahones F, Esteva I. Pro12Ala polymorphism of the PPARG2 gene is associated with type 2 diabetes mellitus and peripheral insulin sensitivity in a population with a high intake of oleic acid. *The Journal of Nutrition* 2006;136:2325–2330.
- St-Pierre J, Miller-Felix I, Paradis ME, et al. Visceral obesity attenuates the effect of the hepatic lipase *-514C→T* polymorphism on plasma HDL-cholesterol levels in French-Canadian men. *Molecular Genetics and Metabolism* 2003;78:31–36.

- Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH, Selhub J. Conversion of 5-Formyltetrahydrofolic Acid to 5-Methyltetrahydrofolic Acid Is Unimpaired in Folate-Adequate Persons Homozygous for the *C677T* Mutation in the Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene. *The Journal of Nutrition* 2000;130(9):2238–2242.
- Storlien LH, Kraegen EW, Chisholm DJ, Ford GL, Bruce DG, Pascoe WS. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science* 1987;237:885–888.
- Tai ES, Corella D, Deurenberg-Yap M, et al. Dietary fat interacts with the *-514C→T* polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on plasma lipid profiles in a multiethnic Asian population: the 1998 Singapore National Health Survey. *The Journal of Nutrition* 2003;133:3399–3408.
- Trebble T, Arden NK, Stroud MA, et al. Inhibition of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 6 production by mononuclear cells following dietary fish-oil supplementation in healthy men and response to antioxidant co-supplementation. *The British Journal of Nutrition* 2003;90:405–412.
- Wallace F, Miles EA, Calder PC. Activation state alters the effect of dietary fatty acids on pro-inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cytokine* 2000;12:1374–1379.
- Whitehead VM, Pratt R, Viallet A, Cooper BA. Intestinal conversion of folinic acid to 5-methyltetrahydrofolic acid in man. *British Journal of Haematology*;22:63–72.
- Xu X, Gammon MD, Zhang H, Wetmur JG, Rao M, Teitelbaum SL, Britton JA, Neugut AI, Santella RM, Chen J. Polymorphisms of one-carbon-metabolizing genes and risk of breast cancer in a population-based study. *Carcinogenesis* 2007;28(7):1504–1509.
- Yamasaki Y, Katakami N, Sakamoto K, Kaneto H, et al. Combination of Multiple Genetic Risk Factors Is Synergistically Associated With Carotid Atherosclerosis In Japanese Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(11):2445–2452.

Zhang C, Lopez-Ridaura R, Rimm EB, Rifai EB, Hunter DJ, Hu FB. Interactions between the $-514C \rightarrow T$ polymorphism of the hepatic lipase gene and lifestyle factors in relation to HDL concentrations among US diabetic men. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81:1429–1435.

Ziesel SH. Nutrigenomics and metabolomics will change clinical nutrition and public health practice: insights from studies on dietary requirements for choline. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2007;86:542–548.