

MICHAL PRAVENEČ, PAVEL FLACHS, HANA KUBOVÁ
Fyziologický ústav AVČR, v. v. i.

BIOMODELY

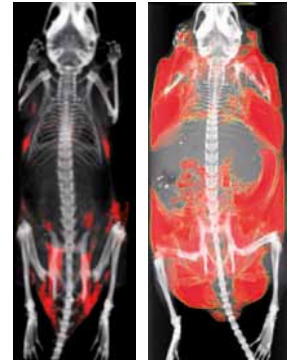
PROJEKT PRO ODHALENÍ GENETICKÝCH DETERMINANT
PREDISPONUJÍCÍCH K METABOLICKÉMU SYNDROMU

Metabolický syndrom je onemocnění, charakterizované výskytem hned několika rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění. Klinicky je metabolický syndrom definován jako současný výskyt tzv. centrální obezity (objem pasu ≥ 94 cm u mužů a ≥ 80 cm u žen) společně s alespoň dvěma z těchto poruch: vysoké hladiny triglyceridů, nízké hladiny HDL cholesterolu, vysoký krevní tlak, vysoká hladina glukózy na lačno, případně diabetes 2. typu. Současný výskyt několika rizikových faktorů několikanásobně zvyšuje pravděpodobnost vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Podle posledních odhadů, je v České republice prevalence metabolického syndromu asi 20 %, což představuje značnou zátěž pro systém našeho veřejného zdravotního pojištění. Odhalení variant genů predisponujících k jednotlivým složkám metabolického syndromu by přispělo k lepšímu pochopení patogeneze a následně k racionálnější prevenci a terapii této choroby. Běžné lidské choroby, jako je metabolický syndrom, jsou podmiňeny multifaktoriálně, tzn. více geny s malými účinky a jejich interakcemi s faktory prostředí, a proto je jejich identifikace nesmírně obtížná. Mnoho nadějí bylo vkládáno do sekvenace lidského genomu. Během několika posledních let byly publikovány výsledky mnoha celogenomových asocičních studií, které porovnávají rozdíly ve frekvenci výskytu běžných polymorfismů, pokrývajících celý lidský genom mezi skupinami pacientů a kontrolních osob. Tyto studie však zatím odhalily jen malý zlomek geneticky podmíněné variability jednotlivých komponent metabolického syndromu (přibližně do 10 %) a navíc tyto studie jsou založeny pouze na statistických důkazech a jen výjimečně odhalily kauzální mutace odpovědných genů. Vzhledem k tomu se stále více pozornosti upíná ke zvířecím modelům lidských onemocnění. Nově vznikající centrum

1. Struktura centra BIOMODELS. Oranžové bloky označují nově vznikající jednotky, zelené pak sumarizují již dostupné možnosti produkce zvířat a funkční analýzy. Tmavě a světle modré pole odděluje část určenou pro tvorbu, chov a ustájení od části zaměřené na funkční analýzu biomodelů.

Biomodels, centrum pro produkci a funkční analýzu biomodelů civilizačních chorob je zaměřeno právě na produkci těchto zvířecích modelů a jejich funkčně genomickou analýzu. Centrum vzniklo za podpory strukturálních fondů EU a je složeno ze čtyř pracovišť. Pracoviště **Biomodely** slouží k produkci a chovu specifických kmenů laboratorního potkana, zvířecích modelů lidských chorob, získávaných pomocí cílené selekce a nově dostupných genomových manipulací. Další tři nově vzniklá pracoviště jsou určena pro funkční analýzu zvířecích modelů. Jejich struktura a vybavení umožní opakované sledování zvolených funkčních parametrů při minimalizaci stresu a potřeby invazivních zásahů (obr. 1). Jde o **Laboratoř pro celotělovou analýzu**, určenou pro sledování základních anatomických, fyziologických a metabolických parametrů. Pracoviště je vybavené rentgenovým počítačovým tomografem (CT) speciálně určeným pro malá laboratorní zvířata, doplněným o pozitronovou emisní tomografii (PET). Přístroj umožňuje opakované rychlé analýzy celkového tělesného složení (např. obsah a rozložení tuku v těle – obr. 2), a podobně jako v humánní nukleární medicíně, důkladná vyšetření orgánových a tkáňových patologií. Dalším zařízením je systém pro nepřímou kalorimetrii, doplněný o telemetrické sledování pohybové aktivity a tělesné teploty. Standardní chovná nádoba s pokusným zvířetem je umístěna do komory přístroje (k dispozici je 8 samostatných komor) a na základě měření množství spotřebovaného O_2 a vydechovaného CO_2 je analyzován celotělový metabolismus (celkový energetický obrat, poměr oxidace jednotlivých živin – cukrů, tuků a proteinů) a metabolické reakce na zatížení (např. změna teploty, hladovění, jednorázové podání roztoku glukózy atd.). Také metoda nepřímé kalorimetrie je užívána v klinické praxi na diabetologických a obezitologických pracovištích. Dalším pracovištěm je **Laboratoř analýzy chování**, zaměřená na sledování dalších faktorů, ovlivňujících vznik a průběh metabolického syndromu, jako je fyzická aktivita, míra stresu a možnosti snížení jeho působení. Základní vybavení tohoto pracoviště představují fenotypizační klece se stavebnicovým vybavením, umožňujícím sledovat fyzickou aktivitu, úkryt, učení nových úloh a automatické

2. Ukázka segmentace tukové tkáně u normální (a) a obézní (b) myši pomocí rentgenového počítačového tomografu Albira.



ké měření všech těchto činností v přirozeném prostředí zvířete. Možné je i paralelní měření fyziologických a behaviorálních parametrů, například krevního tlaku a fyzické aktivity. **Laboratoř homeostázy krevního tlaku** je vybavená třemi systémy pro chronické sledování krevního tlaku, srdečního tepu, biopotenciálů (EKG, EEG, EMG) a tělesné teploty telemetrickou a pletysmografickou metodou. Výhodou zvolených technologií je možnost sledovat funkční parametry v přirozeném prostředí a s minimalizací stresu.

Jako příklad zvířecího modelu a jeho využití lze uvést spontánně hypertenzní potkany kmene SHR (obr. 3). Tento kmen je nejčastěji používaný model lidské esenciální hypertenze; prakticky každý lék na vysoký krevní tlak byl před uvedením do klinické praxe



3. Transgenní SHR potkani získání pomocí transpozonových konstruktů Sleeping Beauty se zeleným fluorescenčním proteinem.

testován na SHR potkanech. Kromě vysokého krevního tlaku, mají SHR potkani i poruchy metabolismu glukózy a lipidů. Pro odhalení genů podmiňujících vysoký krevní tlak a metabolické poruchy u kmene SHR, bylo ve Fyziologickém ústavu AV ČR ve spolupráci s 1. lékařskou fakultou Univerzity Karlovy vytvořeno celkem 30 speciálních kmenů, tzv. rekombinantních inbredních (RI) kmenů, odvozených od kříženců kmene SHR s kmenem Brown Norway (viz Vesmír 74, 485–487, 1995). RI kmeny lze přirovnat k zafixované geneticky segregující F2 generaci. Jednotlivé RI kmeny jsou inbrední (tj. geneticky shodné), ale nesou různé kombinace variant genů obou rodičovských kmenů. Pro odhalení genů podmiňujících hypertenzi a metabolické poruchy se používají vazebné a korelační analýzy. Obrovskou výhodou pro tyto analýzy je skutečnost, že všechny znaky stanovené u RI kmenů jsou kumulativní. V rámci široké mezinárodní spolupráce při řešení 2 integrovaných projektů 6. a 7. rámcového programu EU (EURATools a EURATRANS) byla stanovena sekvenace genomů obou rodičovských kmenů, identifikováno přes 20000 polymorfismů a stanovena řada jednodušší geneticky podmíněných intermediárních fenotypů mezi variabilitou na úrovni DNA a komplexními metabolickými znaky. Pomocí vazebných a korelačních analýz mezi intermediárními fenotypy a metabolickými znaky jsou pak identifikovány geny podmiňující komplexní fenotypy. Takto byly u kmene SHR a následně i u lidí odhaleny první geny podmiňující například predispozici k vysokému krevnímu tlaku, inzulínové rezistenci nebo hypertrofií levé srdeční komory.

