

ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ
Společnost patologické a klinické fyziologie - Sekce pro aterosklerosu
Česká pediatrická společnost - Komise pro prevenci aterosklerosy v dětském a
adolescentním věku

SLOVENSKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST
Společnost klinické biochemie - Sekce pro aterosklerosu

ve spolupráci se Společnostmi klinické biochemie, všeobecného lékařství, praktických lékařů pro děti
a dorost, klinické výživy a intenzivní metabolické péče, obesitologickou a diabetologickou

4. INTERNÍ KLINIKA 1. LF UK

INSTITUT POSTGRADUÁLNÍHO VZDĚLÁVÁNÍ VE ZDRAVOTNICTVÍ PRAHA
NÁRODNÍ CENTRUM OŠETŘOVATELSTVÍ A NELÉKAŘSKÝCH ZDRAVOTNICKÝCH
OBORŮ BRNO

Vás vítají na symposiu s edukačním programem

pořádaném pod záštitou děkana 1. LF UK prof. MUDr. Tomáše Zimy, DrSc.

A T H E R O S K L E R O S A

2 0 1 1

diagnostika, léčba, prevence v dětském i dospělém věku

P r a h a 7. - 9. září 2011

Hlavní název: ATHEROSKLEROSA 2011
Podnázev: Diagnostika, léčba, prevence v dětském i dospělém věku
Vydavatel: IV. interní klinika 1. LF UK Praha

Náklad: 100 ks
Měsíc a rok vydání: září 2011
Cena: neprodejné

ISBN: 978-80-254-8809-6

ČESTNÉ PŘEDSEDNICTVO

Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc.

děkan 1. LF UK Praha

Prof. MUDr. Jozef Kollár, DrSc.

president Sekce pro atherosklerosu SSKB

Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

proděkan 1. LF UK Praha

PROGRAMOVÝ VÝBOR

Josef Hyánek, Jozef Kollár, Eva Kohlíková, Marie Kunešová, Magdalena Lejsková, Petr Nachtigal, Jaroslav Racek, František Stožický, Eva Tvrzická, Miloš Votruba, Zdeněk Zadák, Miroslav Zeman, Aleš Žák

ADRESA SYMPOSIA

Lékařský dům
Sokolská 31
120 26 Praha 2

tel.: 224 266 201-4

VŠEOBECNÉ INFORMACE

MÍSTO KONÁNÍ SYMPOSIA

Lékařský dům, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel. +420 224 266 201-4

PŘEDNÁŠKY

Délka jednotlivých sdělení je uvedena v závorce za českým (slovenským) názvem. Tato doba v sobě zahrnuje i čas pro diskusi. U vyžádaných přehledných sdělení má autor právo vyčerpat celý čas přednáškou a diskuse bude umožněna ve zbylém čase na konci tématického bloku.

PRESENTACE POSTERŮ

Autoři vyvěsí své postery před 9. hodinou ráno v den, kdy jsou uvedeny v programu. Večer po skončení programu je třeba postery opět odstranit. Z technických důvodů nelze umožnit vyvěšení všech posterů po dobu 3 dnů. Diskuse k posterům bude vedena v udaném čase v přednáškovém sále.

CERTIFIKÁT

Certifikát bude účastníkům symposia rozeslán do konce roku 2011.

OHODNOCENÍ

ČLK: č. akreditace 0004/16/2006, č. akce 23939, 18 kreditů

KVVOPZ: č. akce 326/2011, 12 kreditů

ČAS: č. akce KK/2560/2011

PROGRAM

STŘEDA 7. 9. WEDNESDAY

9,00 - 10,30 *Moderátoři: J. Kollár, M. Votruba*

J. Kollár (UPJŠ Košice):

Metabolický syndróm zo zorného uhla molekulárnej a celulárnej patológie (40')

Metabolic syndrome from the view molecular and cellular pathology

L. S. Kremmyda (1. LF UK Praha):

Omega 3 mastné kyseliny v těhotenství, vývoji a růstu (40')

Omega-3 fatty acids in gestation, growth and development

11,00 - 13,00 *Moderátoři: P. Nachtigal, M. Zeman*

M. Zeman, R. Jiráček, M. Vecka, A. Žák (1. LFUK a VFN Praha):

Vícenenasycené mastné kyseliny n-3 řady a deprese (40')

Polyunsaturated fatty acids n-3 family and depression

P. Nachtigal, L. Večeřová, J. Rathouská, Z. Stráský (FarmF UK Hradec Králové):

Endoglin jako možný marker aterosklerózy a účinnosti podávání statinů (40')

Endoglin as a possible marker of atherosclerosis and statin treatment efficiency.

M. Zemanová (1. LFUK a VFN Praha):

Zkušenosti s nutriční podporou u onkologických pacientů s karcinomem jícnu (40')

Experiences with nutritional support in oncological patients with esophageal cancer

14,00 - 16,00 *Moderátoři: M. Votruba, M. Vecka*

M. Votruba (MI-VO-LA Praha):

Podíl proteinové složky lipoproteinů LDL na vznik oxidované formy LDL (30')

The participation of protein section of LDL on the origin of oxidative form of LDL particle.

M. Vecka (1. LFUK Praha):

Význam peroxidace kyseliny linolové jako hlavního procesu peroxidace v částicích LDL

The role of peroxidation of linoleic acid, main peroxidation process in lipids of LDL (30')

P. Zouhar, P. Flachs (FgÚ AV ČR Praha):

Kombinované působení kalorické restrikce a polynenasycených mastných kyselin řady n-3

Combined effect of caloric restriction and polyunsaturated fatty acids n-3 family (30')

M. Maxová, H. Malínská, H. Seidlová, J. Urbanová, L. Kazdová (IKEM Praha):

Vliv spontánní fyzické aktivity na parametry metabolického syndromu (20')

The influence of physical activity on metabolic syndrome parameters

M. Parisová, T. Navrátil, I. Šestáková, E. Kohlíková, M. Petr (FTVS UK a AV ČR Praha):

Umělé fosfolipidové membrány jakožto modely reálných membrán a transport nabitých částic přes ně. (P)

Artificial phospholipid membranes as models of real membranes and transport of charged particles across them

ČTVRTEK 8. 9. THURSDAY

9,00 - 11,00 *Moderátoři: M. Cahová, H. Malínská*

L. Kazdová, H. Malínská, M. Maxová, V. Zídek (IKEM a FGÚ AV ČR Praha):

Lipotoxicita a ektopická akumulace lipidů v patogenesi metabolického syndromu a asociovaných komplikací (30')

Lipotoxicity and ectopic lipid accumulation in pathogenesis of metabolic syndrome and its complications.

E. Páleníčková, Z. Papáčková, O. Oliyarnyk, H. Daňková, M. Cahová, M. Pravenec, L. Kazdová (IKEM a FGÚ AV ČR Praha):

Nový kryší model jaterní steatózy a chronického zánětu (30')

New rodent model for research of fatty liver disease and insuline resistance.

M. Cahová, Z. Drahota, O. Oliyarnyk, E. Páleníčková, Z. Červinková, L. Kazdová (IKEM Praha):

Možnosti ovlivnění oxidačního stresu při jaterní steatóze – vliv metforminu (30')

Oxidative stress and liver steatosis: the potential of metformin treatment

L. Ťoukálková (BN Zlín):

Steatosa jaterní a hypercholesterolemie – vzácná diagnosa (20')

Liver steatosis and hypercholesterolemia - a rare diagnosis

11,00 - 13,00 *Moderátoři: J. Kollár, J. Dostálová*

J. Kollár (UPJŠ Košice):

Prevalencia obezity vo východoslovenskej populácii - problém sociálny, výživový a starnutia? (40')

Obesity prevalence of the East Slovakian population, social, nutritional and aging problem.

J. Dostálová, C. Perlín (VŠCHT Praha):

Mýty o potravinách a výživě – komplikace vzdělávání v prevenci onemocnění výživou (40')

Myths on nutrition and food - a complication of education in prevention of nutrition dependend deseases.

14,00 - 16,00 Moderátoři: *J. Dvořáková, M. Lejsková*

M. Lejsková (FTN Praha):

Prevence kardiovaskulárních chorob u žen (Aktualisace 2011) (30´)

Prevention of cardiovascular disease in women (Update 2011)

J. Dvořáková, L. Dubská, L. Táborský, J. Hyánek (Nemocnice Na Homolce Praha):

Glykemie a statiny (30´)

Fasting plasma glucose and statins

M. Koudová, R. Vlčková, M. Bittóová, R. Alánová, I. Slepíčková, E. Lavická, M. Hlaváčová, G. Izrael, V. Indráková, M. Majer, J. Karas, E. Kohlíková (GHC Genetics a FTVS UK Praha):

Atherogenní genetické varianty u mužů a žen české populace (30´)

Atherogenic genetic variants in the Czech population

O. Oliyarnyk, M. Maxová, H. Seidlová, J. Urbanová, L. Kazdová, V. Zidek, V. Landa, M. Pravenec (IKEM a FGÚ AV ČR, Praha):

Transgenní exprese transkripčního faktoru Nrf2 zmirňuje oxidační stres a projevy metabolického syndromu u spontánně hypertenzních potkanů (25´)

Transgenic expression of the transcription factor Nrf2 ameliorates oxidative stress and metabolic syndrome in spontaneously hypertensive rats

R. Večeřa, A. Zachařová, Z. Matušková, M. Šiller, E. Anzenbacherová, P. Anzenbacher (LF UP Olomouc):

Rosuvastatin zvyšuje expresi cytochromu P450 4A u hereditárně hypertriglyceridemických potkanů (P)

Rosuvastatin induces expression of CYP4A in hereditary hypertriglyceridemic rat

P Á T E K 9. 9. F R I D A Y

9,00 - 11,00 *Moderátoři: Z. Zadák, J. Macášek*

Z. Zadák, E. Havel, A. Tichá, R. Hyšpler (LF UK Hradec Králové):

Dynamika lidského lipidomu ve stresové zátěži – klinické důsledky (30´)
Dynamic properties of human lipidoma in stress - clinical consequences

H. Malínská, M. Maxová, O. Oliyarnyk, L. Kazdová (IKEM Praha):

Niacin zvyšuje sérové hladiny adiponektinu a oxidaci mastných kyselin ve svalech (25´)
Niacin increases serum level of adiponectin and fatty acid oxidation in muscle

J. Macášek, T. Krechler, M. Zeman, A. Žák (1 LFUK a VFN Praha):

Adipocytokiny u nádorových chorob (30´)
Adipocytokines in tumour diseases

J. Kodydková, L. Vávrová, J. Macášek, T. Krechler, A. Žák (1 LFUK a VFN Praha):

Antioxidační enzymy a karcinom pankreatu (20´)
Antioxidant enzymes and the carcinoma of pancreas

11,30 – 13,30 *Moderátoři: J. Hyánek, F. Stožický*

J. Ždychová, I. Lesná-Králová, L. Kazdová (IKEM, Praha):

Úloha perivaskulární tkáně v rozvoji kardiovaskulárních poruch (30´)
Role of perivascular fat tissue in the development of cardiovascular disorders

J. Koprovičová, D. Petrášová (UPJŠ Košice):

Nadváha u mužů středního věku v korelaci s rizikem vzniku metabolického syndrómu (30´)
Overweight in middle aged men in correlation with risk of development of metabolic syndrome.

D. Petrášová, I. Bertková, J. Koprovičová (UPJŠ Košice):

Monitoring rizikových faktorů aterosklerózy u dětí s familiární zátěží. (P)
Monitoring of risk factors of atherosclerosis in children with family - history

D. Palyzová, J. Riedlová, V. Kožich (3. LFUK a FNKV Praha):

Homocystein, vitaminy b a porodní hmotnost v české populaci (P)
Homocysteine, vitamins B and birth weight in Czech population

J. Hyánek, L. Dubská, L. Táborský, J. Privarová (Nemocnice Na Homolce):

Naše první zkušenosti s Tredaptivem (30´)
Our first experiences with Tredaptive

Závěr symposia

Příští symposium se bude konat ve dnech 12. – 14. 9. 2012

O B S A H

Autor	Str.	Autor	Str.
Cahová	1	Petrášová	42
Dostálová	6	Řoukálková	46
Dvořáková	11	Večeřa	48
Hyánek	57	Votruba	64
Kazdová	12	Zeman	65
Kodydková	58	Zemanová	52
Koprovíčová	14	Zouhar	53
Koudová	62	Ždychová	54
Lejsková	S1		
Macášek	S9		
Malínská	19		
Maxová	23		
Nachtigal	S13		
Oliyarnyk	27		
Páleníčková	31		
Palyzová	35		
Parisová	38		

MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ OXIDAČNÍHO STRESU PŘI JATERNÍ STEATÓZE: Vliv METFORMINU

M. Cahová¹, Z. Drahota², E. Páleníčková¹, O. Oliyarnyk¹, Z. Červinková³, L. Kazdová¹

¹IKEM Praha, ²FgÚ AV ČR Praha, ³LF UK Hradec Králové

The aim of this study was to determine the effect of metformin on the oxidative stress in plain dietary induced steatosis and in combination with acute depletion of glutathione. *In vitro*, metformin decreased the respiratory capacity of isolated mitochondria towards NADH-dependent substrate (indicator of the inhibition of complex I). We further showed that the dose of metformin necessary for the 50% inhibition of respiration decreases with the length of preincubation of mitochondria in the presence of metformin. Metformin administered for 10 weeks in the diet (150 mg/kg b.wt.) decreased the oxidation of fatty acids in liver slices incubated *ex vivo* (decreased production of CO₂ and increased accumulation of Krebs cycle intermediates). Long-term administration of metformin potentiated the decreased oxidation of substrates induced by the administration of high-fat diet. HFD significantly increased the oxidative stress in the liver. In contrast to this, administration of metformin alleviated the lipoperoxide formation (TBARS, conjugated diens) both in plain steatosis and after the acute glutathione depletion due to the acetaminophen application. Metformin increased the mitochondrial superoxidismutaze (Mn-SOD) in the liver. In conclusion, we proved the protective effect of metformin against oxidative stress of various origins. We explain this phenomenon as the consequence of both the increased Mn-SOD activity and the quantitative restriction of electron transport through mitochondrial respiratory chain due to the inhibition of complex I.

Úvod

Celosvětově rostoucí výskyt obezity je hnací silou epidemického šíření diabetu 2. typu (T2D). Odhaduje se, že v roce 2025 bude T2D postiženo až 300 mil lidí, tj. přes 5% celosvětové populace (King 1998). Metformin představuje lék první volby při léčbě T2D již od 50. let 20. století. Používá se při léčbě pacientů jak s T2D, tak i s metabolickým syndromem. Navzdory dlouhé době jeho používání není dosud přesný mechanismus jeho působení plně objasněn. V naší práci jsme se soustředili na vliv metforminu na dýchání jaterních mitochondrií a oxidační stres při jaterní steatóze, která představuje častou komplikaci metabolického syndromu a T2D.

Metodika

Samci kmene Wistar (300±12g) byli krmeni standardní nebo vysokotukovou (VTD) dietou 10 týdnů. Části zvířat byl v potravě podáván metformin 150 mg/kg t.hm. Akutní deplece glutationu byla navozena jednorázovým podáním 1000 mg/kg acetaminofenu (APAP) *per os*. Respirační kapacita mitochondrií byla stanovena podle spotřeby kyslíku měřené Clarkovou elektrodou. Jaterní řízky byly inkubovány v KRB pufri (Krebs- Ringer bicarbonate) 2 hod v atmosféře 95% O₂ a 5% CO₂. Oxidace palmitátu, resp. glukózy byla měřena podle konverze ¹⁴C-palmitátu, resp. ¹⁴C-glukózy, na CO₂. Koncentrace redukováného glutationu a aktivita SOD byla měřena dle Kahleová (2009).

Výsledky a diskuse

1. Vliv metforminu na dýchání mitochondrií *in vitro*

Přímý akutní vliv metforminu na dýchací kapacitu mitochondrií jsme testovali podle spotřeby kyslíku na izolovaných jaterních mitochondriích *in vitro* v přítomnosti dvou různých typů

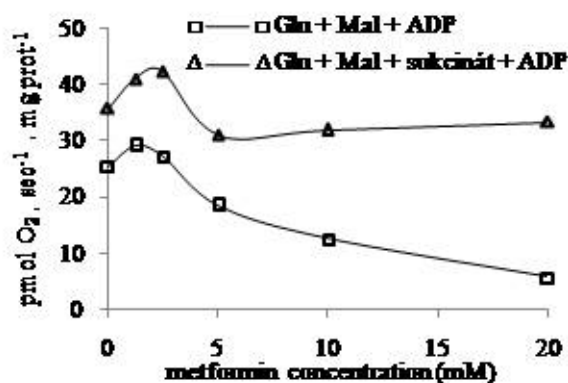
substrátu, které se liší svou závislostí na typu vstupní dehydrogenázy. Využitelnost malátu + glutamátu je striktně závislá na NADH dependentní dehydrogenáze, kdežto sukcinát umožňuje vstup elektronů do dýchacího řetězce i prostřednictvím FADH dehydrogenázy. Z našich výsledků vyplývá (obr. 1a), že metformin inhibuje pouze oxidaci NADH-dependentních substrátů. Významný inhibiční efekt (>50%) byl prokázán při 5 mM koncentraci metforminu, maximální inhibice (80%) bylo dosaženo v přítomnosti 10 – 20 mM metforminu. Metformin ve stejném rozsahu jako přímou spotřebu kyslíku snižuje i respirační kontrolu, tj. indikátor odpáření respiračního řetězce a syntézy ATP (data neuvedena). Zhoršení jak oxidace NADH dependentních substrátů, tak i respirační kontroly v přítomnosti metforminu naznačuje existenci dvou nezávislých mechanismů působení metforminu, tato otázka však vyžaduje další zkoumání.

Uvedené výsledky sice prokazují přímý inhibiční vliv metforminu na oxidaci energetických substrátů v izolovaných mitochondriích, nevysvětlují však jeho působení *in vivo*. Při podávání terapeutických dávek dosahuje koncentrace metforminu v séru přibližně 10-50 μM , tedy hodnotu několiknásobně nižší než je účinná akutní dávka *in vitro*. Owen (2000) a El Mir (2000) ukázali, že metformin díky svému pozitivnímu elektrickému náboji je aktivně zadržován v mitochondriích v závislosti na velikosti membránového potenciálu. Při předpokládané velikosti membránového potenciálu -180 mV může být koncentrace metforminu uvnitř mitochondriální matrix až 1000x vyšší než v okolním prostředí (Owen 2000). Cílem následujícího experimentu bylo ověřit hypotézu, že prodloužením doby inkubace lze dosáhnout významného inhibičního účinku metforminu i při nižších koncentracích. Izolované mitochondrie byly na ledu preinkubovány s 125 μM metforminem po dobu 10 a 30 min. Po 10 min inkubaci jsme prokázali 25% a po 30ti min 50% inhibici mitochondriální respirace (obr. 1b). Delší inkubace vedla ke snížení životnosti samotných mitochondrií a nebylo proto možné testovat i nižší koncentrace metforminu působící delší dobu. Naše výsledky nicméně ukazují na možný mechanismus působení nízkých koncentrací metforminu, tj. časově závislou akumulaci metforminu v mitochondriích a tím zvýšení jeho lokální koncentrace v místě účinku, a podporují platnost výsledků získaných *in vitro* v situaci *in vivo*.

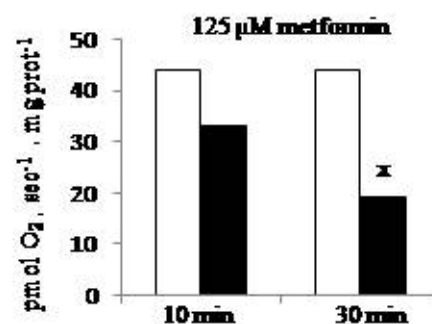
Obr. 1 Vliv metforminu na spotřebu kyslíku v izolovaných mitochondriích *in vitro*.

Údaje představují aritmetický průměr \pm S.E.M., n=6. * p<0,05 VTD vs SD; # p<0,05 VTD+met vs SD; + p<0,05 VTD+met vs VTD, x p<0,05 30 min vs 10 min preinkubace v přítomnosti 125 μM metformin.

1A

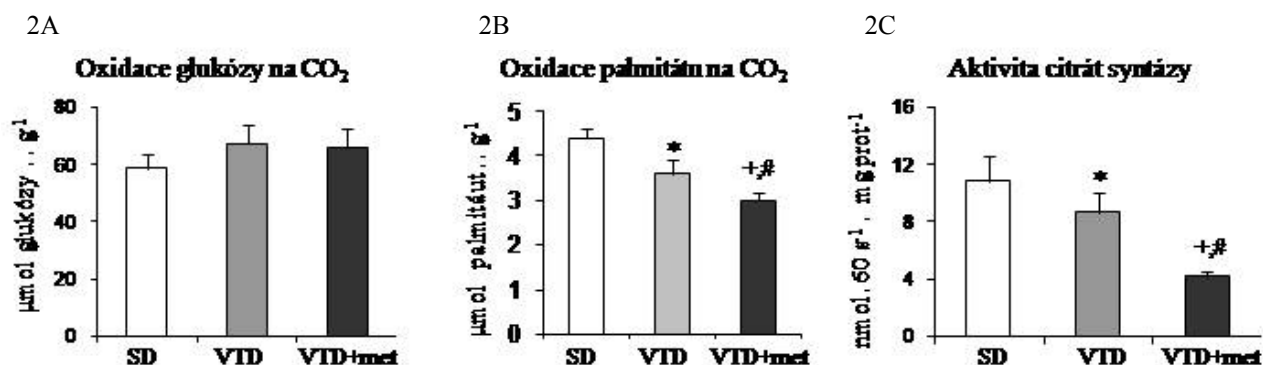


1B



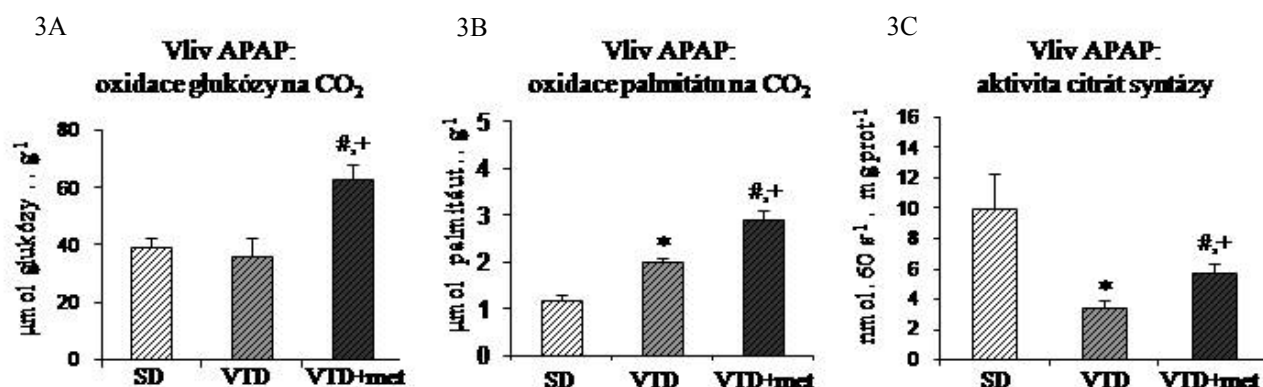
2. Vliv dlouhodobého podávání metforminu v kombinaci s VTD na odolnost mitochondrií vůči akutnímu hepatotoxickému stresu

Prevalence jaterní steatózy u diabetiků a pacientů s MS je téměř 100% a metformin, jako perorální antidiabetikum první volby, je obvykle podáván pacientům dlouhodobě. Cílem následujícího experimentálního uspořádání bylo vytvořit zvířecí model této situace. Potkani kmene Wistar byli krmeni VTD po dobu 10 týdnů, polovina z těchto zvířat dostávala metformin v potravě v denní dávce 150 mg/kg. Koncentrace metforminu v séru na konci pokusu byla $19,6 \pm 2,2 \mu\text{M}$. Schopnost mitochondrií oxidovat substrát jsme hodnotili na jaterních řízcích inkubovaných *in vitro* podle tvorby CO_2 z palmitátu nebo z glukózy a podle akumulace intermediátů Krebsova cyklu (znak neúplné oxidace substrátu). Úbytek mitochondrií jsme hodnotili podle aktivity citrát syntázy (CS) v homogenátu. CS je výlučně mitochondriální enzym a její aktivita vztažená např. na mg celkového proteinu je proto kvantitativním parametrem odrážejícím počet mitochondrií. Podávání samotné VTD ani VTD v kombinaci s metforminem neovlivnilo oxidaci glukózy. Oxidace palmitátu byla snížena už vlivem samotné VTD (obr. 2) a negativní vliv diety byl dále potencionován podáváním metforminu. Zvýšená akumulace intermediátů Krebsova cyklu byla prokázána pouze při kombinovaném podávání metforminu a VTD, což indikuje sníženou utilizaci redukčních ekvivalentů v mitochondriálním respiračním řetězci. Snížení aktivity CS (a tedy i menší počet mitochondrií) jsem prokázali ve skupině VTD a ještě výrazněji ve skupině krmené VTD i metforminem.



Obr. 2 Vliv VTD a metforminu na dýchání jaterních řízků a na aktivitu citrát syntázy. Údaje představují aritmetický průměr \pm S.E.M., $n=6$. * $p < 0,05$ VTD vs SD; # $p < 0,05$; VTD+met vs SD; + $p < 0,05$ VTD+met vs VTD.

Dále nás zajímal vliv podávání metforminu na odolnost steatózní jaterní tkáň vůči akutnímu hepatotoxickému stresu. Ten byl navozen jednorázovým podáním toxické dávky acetaminofenu, který vede k akutní depleci glutathionu a následnému oxidačnímu stresu (APAP 1000 mg/kg i.p., 24 hod před pokusem) části potkanů krmených VTD. Zjistili jsme, že podání APAP snižuje oxidaci MK a glukózy a vede k výraznému poklesu aktivity citrát syntázy pouze u skupin krmených SD a VTD (obr. 3). Naopak podávání metforminu mělo protektivní účinek, tj. zabránilo akutnímu poklesu počtu mitochondrií a snížení oxidační kapacity jak pro glukózu, tak i pro palmitát.



Obr. 3 Vliv akutního podání APAP na dýchání jaterních řízků a na aktivitu citrát syntázy. Údaje představují aritmetický průměr ±S.E.M., n=6. * p<0,05 VTD vs SD; # p<0,05 VTD+ met vs SD; + p<0,05 VTD+met vs VTD.

3. Vliv dlouhodobého podávání metforminu v kombinaci s VTD na oxidační stres

Předchozí výsledky ukazují, že podávání metforminu v kombinaci s VTD na jedné straně snižuje oxidační kapacitu jaterních mitochondrií, na druhé straně však zvyšuje odolnost vůči hepatotoxickému působení APAP. Vzhledem k tomu, že hlavní námi prokázaný účinek metforminu spočívá ve snížení oxidační kapacity mitochondrií, zajímalo nás, zda tato vlastnost může přispět k vysvětlení mechanismu jeho pozitivního působení. Naše výsledky ukazují, že VTD i APAP nezávisle na sobě zvyšují tvorbu lipoperoxidů v mitochondriích a tento účinek je kumulativní (tab. 1). Podávání metforminu tvorbu lipoperoxidů v mitochondriích jednoznačně snižuje, a to jak při samotném podávání VTD, tak i v kombinaci VTD+APAP. Neprokázali jsme vliv metforminu na obsah redukovaného glutationu v mitochondriích, ale zjistili jsme, že v přítomnosti metforminu je významně zvýšená aktivita superoxid dismutázy. Tyto výsledky ukazují, že metformin specificky chrání mitochondrie před poškozením oxidačním stresem a pomáhá tak udržet jejich funkci i při akutní depleci glutationu.

	+ APAP (1000 mg/kg t.hm.)					
	SD	VTD	VTD + met	SD	VTD	VTD + met
CD (nmol · mg prot ⁻¹)	12,8 ± 0,9	16,9 ± 0,8*	12,9 ± 0,8 ⁺	17,6 ± 1,8	21,4 ± 2,3*	17,8 ± 1,5 ⁺
TBARS (nmol · mg prot ⁻¹)	2,7 ± 0,2	4,4 ± 0,3*	3,6 ± 0,1 ⁺	5,16 ± 0,4	6,7 ± 0,5*	4,9 ± 0,3 ⁺
GSH (nmol · mg prot ⁻¹)	7,1 ± 1	4,3 ± 0,5*	4,4 ± 0,4 [#]	4,4 ± 0,3	3,7 ± 0,2	4,2 ± 0,2
Mn-SOD (U · mg prot ⁻¹)	143 ± 13	91 ± 5*	129 ± 7 ⁺	92 ± 6	101 ± 5	133 ± 6 ^{#,+}

Tab. 1. Vliv APAP na oxidační stres. Údaje představují aritmetický průměr ±S.E.M., n=6. * p<0,05 VTD vs SD; # p<0,05 VTD+ met vs SD; + p<0,05 VTD+met vs VTD.

Závěry:

1. *In vitro* metformin akutně inhibuje oxidaci NADH-dependentních substrátů v mitochondriálním respiračním řetězci, avšak dávky metforminu používané v akutním experimentu *in vitro* jsou řádově vyšší než koncentrace stanovené v séru (10 mM vs 10 - 50 μ M). Nicméně při delší preinkubaci mitochondrií s metforminem jsou koncentrace nezbytné k vyvolání inhibičního účinku řádově nižší, pravděpodobně v důsledku aktivního vychytávání metforminu v mitochondriích.
2. *In vivo*, metformin snižuje oxidaci substrátu v mitochondriálním respiračním řetězci a potencuje tak trend navozený už samotným podáváním VTD.
3. Metformin výrazně snižuje oxidační stres v jaterní tkáni, vyvolaný jak chronickým podáváním VTD, tak i akutní deplecí glutationu po podání acetaminofenu. Pozitivní účinek metforminu na oxidační stres si vysvětlujeme jednak významně zvýšenou aktivitou enzymu superoxid dismutázy v přítomnosti metforminu, jednak jako důsledek celkového snížení mitochondriální respirace, které snižuje tvorbu reaktivních sloučenin kyslíku.

Použitá literatura:

1. Kahleová H., et al. Diabetic medicine 2011; 28: 549-559.
2. El-Mir M., et al. JBC 2000; 275: 223-228.
3. Owen M., et al. Biochem J 2000; 348: 607-614.
4. King H., et al. Diabetes Care 1998; 21: 1414-1431.

Studie byla podpořena z grantu IGA MZ ČR NS 9696-3.

MÝTY O POTRAVINÁCH A VÝŽIVĚ – KOMPLIKACE VZDĚLÁVÁNÍ V PREVENCI ONEMOCNĚNÍ VÝŽIVOU

J. Dostálová a C. Perlín

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav chemie a analýzy potravin; Výzkumný ústav potravinářský Praha

Abstract

Nutrition is the important factor in the development of many diseases and therefore is not only important science but subject of interest many groups of people which give nutrition guidelines for healthy living. Many nutrition guidelines are not in accordance with recent scientific knowledge (so called myths on nutrition and food) and can be dangerous for consumer. There are described sources of this false information and most frequent myths presented in Czech media and other sources of myths.

Úvod

Výživa je nevýznamnějším faktorem z faktorů zevního prostředí, které ovlivňují naše zdraví. V literatuře se uvádí, že její podíl je přibližně 40 %. K lidské výživě slouží potraviny jejichž konzumace může přinášet řadu zdravotních rizik. V pořadí rizik z potravin je nesprávné složení stravy (riziko z nesprávné výživy) uváděno ve většině případů na prvním místě a další rizika (riziko mikrobiologické, z přírodních toxických látek, chemických kontaminantů a látek přídatných (aditivních) označovaných kódem E až na místech dalších. Výživa se proto stala nejen významným vědeckým oborem, ale i předmětem zájmu mnoha subjektů, které podávají doporučení jak se stravovat a jaké potraviny si vybírat.

Vedle doporučení, která vycházejí z výsledků výzkumu se v poslední době ve všech typech médií a dalších informačních zdrojích stále častěji objevují nepravdivé, klamavé a zavádějící informace jak o výživě obecně, tak o jednotlivých potravinách. Pro tento typ informací se vžil termín mýty. Mýty pocházejí z různých zdrojů a šíří je různé zájmové skupiny. Dopad důsledného převzetí a aplikace některých těchto informací bohužel může vést až k poškození zdraví. Přesto těmto informacím řada lidí věří, často i lidé se vzděláním v příslušném oboru. Alarmující je rovněž skutečnost, že se s mýty o výživě a potravinách stále častěji setkáváme i u studentů při zkouškách a při diskusi s nimi se ukazuje, že někteří těmto „mýtům“ věří víc, než informacím předávaným ve škole, což velmi znesnadňuje jak úlohu učitele, tak i osvěty v oblasti výživy a potravin obecně.

Nejvýznamnější šířitelé mýtů

- Různé potravinářské lobby a jejich konkurenční boj.
- Výrobci potravin snažící se co nejlépe realizovat na trhu své výrobky.
- Prodejci doplňků stravy s cílem zvýšit jejich prodej.
- Ctizádostiví novináři, kteří chtějí prezentovat senzační zprávy. Ti většinou nemají dostatečné odborné vzdělání ve výživě, potravinářství nebo příbuzných oborech, a tak informaci buď vytrhnou z kontextu nebo špatně interpretují. Důsledkem bývá až šíření poplašných zpráv, kterých jsme v poslední době mohli zaznamenat celou řadu. Např. hysterii kolem výskytu *Listeria monocytogenes* v roce 2006, zprávy o nadlimitních obsazích patulinu nebo pesticidu fenhexamidu v dětské výživě a mnohé další. Ve všech třech případech bylo riziko nebezpečí onemocnění pro spotřebitele velmi malé (Voldřich M., 2010). Mezi šíření poplašných zpráv můžeme zařadit i současnou kauzu s výskytem dioxinů ve vepřovém mase a vejcích.

- Výživoví (nutriční poradci) jsou významným zdrojem mýtů. Za své rady často účtují nemalé částky. Nikdo jejich činnost nekontroluje a navíc živnost nutričního poradce je živnost volná, takže se jím může stát v podstatě kdokoli, i ten který o výživě a potravinách neví vůbec nic. Na nutriční poradce se lidé obracují často, jak jsme např. zjistili anketou mezi studenty. Z 225 studentů by rady u nutričních poradců hledalo 46 %, zatímco u lékaře pouze 31 % (Voldřichová J., 2011).
- Lidé vzdělání v oblasti lékařství, potravinářství a příbuzných oborech, jimž toto vzdělání dodává v očích laické veřejnosti na důvěryhodnosti. Jejich klamavé informace mají původ buď v nedostatečných znalostech nebo patří k zastáncům alternativních směrů výživy, které jsou postaveny na nevědeckém základě. Někteří tyto zastánci se dají označit až za fanatiky.
- Lidé s psychickými poruchami např. moderní psychickou poruchou, nazývanou ortorexie, tedy výživová posedlost.

Mýty o potravinách a výživě se vyskytují ve všech typech medií. Jejich šíření velmi přispěl internet. Jedná se o šíření poplašných, nebezpečných a řetězových zpráv tzv. hoaxů, jejichž častou součástí je žádost o předání zprávy dále co největšímu počtu adresátů. Hoaxy je v češtině možné nalézt na www.hoax.cz. Ze serveru hoax jsou asi nejznámější tyto:

- „Pangasius – je to k jídlu?“
- „Éčka přísady do potravin“
- „Margaríny a zdravotní riziko (Rama s nama)“

Mýty o potravinách a výživě (příklady nejběžnějších mýtů).

„Éčka“

- Všechny přídavné látky s kódem Exxx jsou škodlivé, více nebo méně, bez ohledu na množství a bez ohledu na jejich negativní toxikologické testy.
- Přestože všechna éčka prošla zdravotními testy, mají stejně mnohé z nich na zdraví člověka negativní vliv.
- Studie u éček ověřují jen jednu neškodlivou dávku na den, zatímco člověk obvykle sní více kusů potravin. Tím dochází k hromadění látek v těle a k překročení bezpečné míry.
- Éčka maskují nekvalitní potraviny.
- Konzumace pokrmů bez aditiv vede ke zlepšení zdravotních problémů řady pacientů. U dětí, které jedly stravu bez přídavných látek a nejznámějších alergenů, došlo během tří dnů k vyléčení nebo výraznému zlepšení původního onemocnění, často vymizely i další problémy dětí jako je astma či ekzémy.

Díky svému zajímavému tématu se ale našli „experti“, kteří si boj proti používání potravinových aditiv vzali za své poslání. Na základě buď vytržených sdělení v literatuře, nebo z vlastní iniciativy nejprve rozdělili „škodlivost“ éček do pěti skupin, od přijatelných až po těžce rizikové, a v těchto skupinách obsažená aditiva ocenili trestnými body. V denním tisku se pak objevily články o 10 nejhorších potravinách. Hodnocení bylo snůškou polopravd, lží, neznalosti. Pokusili jsme se popsanou metodou zhodnotit vybranou potravinu. Složení v ní obsažených látek přídavných bylo následující:

E101 vit. B2, E160a β-karoten, E160d lykopen, E161 lutein, E251 dusitan, E262 diacetát Na, E300 vit. C, E307 α-tokoferol, E308 γ-tokoferol, E309 δ-tokoferol, E325 laktát Na E330 kyselina citrónová, E375 niacin, E440 pektin, E 554 fosfáty, E 621 glutamát Na.
Součet: 32 „trestných“ bodů.

To je potravina, která se pohybuje svým skórem škodlivosti asi uprostřed škály zmíněných „nejškodlivějších potravin“. Té by se měl spotřebitel, dbající o své zdraví, zřejmě vyhybat. Asi budete překvapení, když Vám prozradíme, že je to rajče!

Na základě nepřítomnosti škodlivých „éček“ pak nabízejí skupiny podnikavců výrobcům označení na výrobku. Zatím víme o dvou skupinách, které chtěli nabízet tzv. E certifikát (zamítnuto Potravinářskou komorou) nebo logo Zdravá potravina (informace na <http://www.zdravapotravina.cz/znacka-zdravapotravina-cz>)

Mléko

- Čerstvé mléko je zdravější než trvanlivé.
- Mléko zahleňuje.
- Odborníci zastávají názor, že mléko není zdravé.
- Mléko je moc tučné, má moc kalorií.
- Mléko obsahuje nezdravé živočišné tuky a cholesterol.
- Mléko pro člověka není vhodné. Člověk je jediný savec, který pije mléko jiného savce.
- Mléko z obchodu je ředěné vodou a přidává se do něj řepkový olej.

Tuky

Mýty o složení tuků a jejich vlivu na zdraví

- Dnešní margaríny se neliší od margarínů, které se používaly v době krize jako náhražky másla.
- Margaríny jsou stále stejné a výrobci nabízejí jen „kosmetické úpravy“ např. nový obal, vyšší obsah vitaminů.
- Margaríny ucpávají cévy a obsahují velmi mnoho transfigurovaných mastných kyselin (některé přes 50 %).
- Omega mastné kyseliny největší nesmysl, ty naopak zacpávají cévy a způsobují záněty.
- Margaríny zvyšují celkový cholesterol a LDL a snižují HDL cholesterol.
- Většina odborníků na výživu dnes prohlašuje, že obyčejné máslo je lepší a lidé by ho měli jíst.
- Řepkový olej je vhodný jen na „bionaftu“.
- Kokosový tuk je zdravý (jeden z nových mýtů).
- Všechny tuky jsou špatné.
- Zdravá strava a konzumace tuků se vylučují.

Mýty o hubnutí

- Když chci hubnout, nesmím jíst žádný tuk
- Je jedno, zda jím máslo nebo rostlinný tuk, po obojím se tloustne.

Mýty o výrobě rostlinných tuků (margarínů)

- Výroba rostlinných tuků je příliš průmyslová
- Máslo je přírodní produkt, zatímco margaríny musí být vyráběny složitým technologickým procesem, a nejsou tedy přírodním tukem.

Maso

- V naší stravě je obsaženo mnoho bílkovin, je třeba vynechat maso (i ve výživě dětí).
- Kuřecí maso je plné hormonů.
- Kuřecí maso je méně tučné než vepřové.
- Hovězí způsobuje rakovinu, obzvláště rakovinu tlustého střeva.
- Vegetariáni se dožívají vyššího věku, jsou štíhlejší a méně agresivní.

Vejce

- Nosnice jsou krmeny hormony a antibiotiky, které přecházejí do vajec.
- Vejce jsou hlavní (často i jediný) zdroj salmonel.
- Domácí vejce jsou lepší než vejce z velkochovů.
- Bio vejce jsou kvalitnější než vejce z klecových chovů.
- Vejce zvyšují cholesterol v krvi.

Biopotraviny

- Biopotraviny jsou zdravější než běžně vyráběné potraviny.
- Biopotraviny mají nižší obsah nasycených tuků a cholesterolu.
- U bio ovoce a zeleniny je obsah vitaminů a látek vhodných pro náš organismus mnohem koncentrovanější než u běžných potravin.

Řadu dalších mýtů můžeme nalézt v knize L. Oliveriusové „Mýty a pověry o výživě“.

Do sféry mýtů patří i nesprávné interpretace informací které jsou po odborné stránce v pořádku. Jako příklad lze uvést informaci, že tuk bio mléka obsahuje výrazně více (až o desítky procent) esenciálních mastných kyselin linolové a linolenové. Obsah těchto kyselin v mléčném tuku je v řádu jednotek procent a při obsahu cca 4 % tuku v mléce je tedy toto zvýšení z hlediska výživy zcela zanedbatelné. Rovněž tvrzení, že křepelčí vejce obsahují méně cholesterolu než vejce slepičí je zavádějící. Obsah cholesterolu na jednotku hmotnosti je v podstatě stejný, ale hmotnost křepelčích vajec je 6x nižší než vajec slepičích.

Je třeba zmínit ještě jeden fenomen, který můžeme zařadit k mýtům o potravinách a to je snaha výrobců přesvědčit spotřebitele informacemi na obalech, že se jedná o kvalitní výrobek, přičemž jde většinou o výrobek nekvalitní nebo náhražku. Text na etiketě, ale není většinou v rozporu se zákonem o potravinách. Nejčastěji slibují výrobci na obale ovoce, které ve výrobku není vůbec nebo jen v minimálním množství – desetiny procenta. Rekord asi drží nápoj z bílého čaje, kde je bílého čaje dvě setiny procenta. Velký přehled výrobků, které obsahují klamavé informace na obalech uveřejnila MF DNES v příloze TEST dne 18.2.2011. V současné době je snaha tyto informace co nejvíce omezit novými legislativními opatřeními.

Na závěr příklad jednoho úsměvného mýtu absurdní závislosti. Na ostrově Jersey ve Velké Británii bylo zjištěn kuriózní vztah mezi porodností a sezónou jerseyjských ranných brambor (Jersey Royal Potato). V ostrovní matrice bylo od r. 1997 pozorováno, že v období ledna až března se každý rok na ostrově narodí asi 170 dětí, tj. mnohem více, než v dalším období. Toto datum je přesně 9 měsíců po bramborové sklizni, která na Jersey probíhá v období od dubna do června.

Marketingový expert to komentoval tím, že jejich brambory jsou skutečně něco extra. Schopné konzumu jsou sice jen krátce, ale zato je lze zařadit nejen mezi vzácné ostrovní lahůdky, ale projevují se i jako podněcovatele dobré nálady a pohody a také sexuální aktivity. Buďto to bude reálná šance zvýšit v některých oblastech porodnost konzumem jerseyjských brambor anebo vtipná mystifikace typu našeho Járy da Cimrmana.

Závěr

Dopad důsledného převzetí a aplikace některých těchto informací bohužel může vést až k poškození zdraví. Přesto těmito informacím řada lidí věří, často i lidé se vzděláním v příslušném oboru. Alarmující je rovněž skutečnost, že se s mýty o výživě a potravinách stále častěji setkáváme i u studentů při zkouškách a při diskusi s nimi se ukazuje, že někteří těmito „mýtům“ věří víc, než informacím předávaným ve škole, což velmi znesnadňuje jak úlohu učitele, tak i osvěty v oblasti výživy a potravin obecně. Boj s mýty je „boj s větrnými mlýny“. Je ale nutné, aby skuteční odborníci častěji vystupovali v médiích a tím alespoň trochu „zřídili“ nepravdivé a klamavé informace. Významně by přispělo i převedení živnosti

„nutriční poradce“ ze živnosti volné na živnost vázanou. Vymýtí mýty se nikdy nepodaří, ale přesto by se odborníci s přispěním státních orgánů měli snažit alespoň jejich vliv na obyvatelstvo snížit.

Literatura

1. HOAX, dostupné na: <http://www.hoax.cz>, 21.2.2011
2. Oliveriusová L. Mýty a pověry o výživě, EB nakladatelství, 2003.
3. Perlín C., Dostálová J. Potravinové mýty jako informační škodná. Výživa a potraviny, v tisku.
4. Voldřich M. Zdravotní rizika potravin – šíření poplašných zpráv? Svět potravin a kouzlo biotechnologií. VŠCHT, KEY Publishing, Ostrava 2010.
5. Voldřichová J. Výživová doporučení pro dospělé obyvatelstvo. Bakalářská práce, Ústav chemie a analýzy potravin, 2011.

Většina mýtů byla převzata z různých typů medií z posledních let.

Poděkování: Financováno z grantu MŠMT VZ č. 604613305

GLYKEMIE A STATINY**FASTING PLASMA GLUCOSE AND STATINS****J. Dvořáková, L. Dubská, L. Táborský, J. Hyánek***OKBHI, Nemocnice Na Homolce, Praha 5*

According to the results of statin trials' meta-analysis statin use was associated with increased risk for developing diabetes. The aim of our study was to evaluate the effect of long-term statin treatment /atorvastatin (n = 51 patients), simvastatin (n = 37 patients)/ on fasting plasma glucose. Both groups showed statistically significant decrease of LDL cholesterol (P < 0.0001). No significant changes were seen in fasting plasma glucose before statin treatment and after five years of treatment in both groups.

V posledních měsících se hodně hovořilo o riziku rozvoje diabetu 2. typu při léčbě statiny, byly provedeny metaanalýzy velkých klinických studií. Nás zajímalo, jaké výsledky budou u našich pacientů na statinové léčbě.

Náš soubor obsahuje 88 pacientů (mužů a žen) ve věku 30 – 70 let v primární i sekundární prevenci aterosklerózy, kteří dosud neužívali žádná hypolipidemika a u nichž byla hypolipidemická léčba indikována. Byl jim nasazen atorvastatin nebo simvastatin a pacienti je užívali beze změny dávky alespoň po dobu 3 let.

Před nasazením medikace, po třech a šesti měsících užívání, po roce a dále pak v ročních intervalech (max. po dobu 5 let) byly provedeny odběry krve. Zaměřili jsme se na sledování glykemií nalačno a hladin lipidových parametrů, které byly stanoveny běžnými metodami, LDL cholesterol byl stanoven přímou metodou. Vyloučení ze sledování byli pacienti s prokázaným diabetem a s hodnotou glykemie nalačno před nasazením léčby nad 6,5 mmol/l.

Ve skupině léčené atorvastatinem (n = 51, 25 M, 26 Ž) došlo po roce léčby ke statisticky významnému poklesu LDL cholesterolu (párový t-test: P < 0,0001), cílových hodnot < 3 mmol/l dosáhlo 78,5 % pacientů. Hodnota mediánu glykemie nalačno činila před léčbou 5,68 mmol/l, po 5 letech léčby 5,92 mmol/l, změna nedosáhla statistické významnosti.

Ve skupině léčené simvastatinem (n = 37, 16 M, 21 Ž) došlo po roce léčby ke statisticky významnému poklesu LDL cholesterolu (párový t-test: P < 0,0001), cílových hodnot < 3 mmol/l dosáhlo 62,2 % pacientů. Hodnota mediánu glykemie nalačno činila před léčbou 5,6 mmol/l, po 5 letech léčby 5,56 mmol/l, změna nedosáhla statistické významnosti.

Dlouhodobá léčba atorvastatinem a simvastatinem nevedla v našem souboru ke statisticky významným změnám glykemie nalačno. Vzhledem k velikosti souboru nelze však naše výsledky srovnávat s výsledky velkých statinových studií.

LIPOTOXICITA A EKTOPICKÁ AKUMULACE LIPIDŮ V PATOGENEZI METABOLICKÉHO SYNDROMU A JEHO KOMPLIKACÍ

LIPOTOXICITY AND ECTOPIC LIPID ACCUMULATION IN PATHOGENESIS OF METABOLIC SYNDROME AND ITS COMPLICATIONS

L. Kazdová¹, H. Malínská¹, M. Maxová¹, V. Zídek²

¹ *Institut klinické a experimentální medicíny, Praha*

² *Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha*

Problematicke inzulinové rezistence a metabolickému syndromu je v posledních letech věnována značná pozornost vzhledem k jejich podílu na kardiovaskulárních onemocněních a narůstající prevalenci diabetu 2.typu. Metabolický syndrom je spojen s pěti- až devítinásobným rizikem rozvoje diabetu a dvoj- až trojnásobným zvýšením kardiovaskulární mortality (Park et al 2003).

Klíčovou úlohu v rozvoji metabolických poruch má nepochybně dyslipidémie a s ní spojené zvýšené ukládání triglyceridů a jejich metabolitů (diacylglycerolů, mastných kyselin s dlouhým řetězcem a ceramidů) mimo tukovou tkáň (ektopicky) do kosterních svalů, jater a myokardu (DeFronzo 2010). K ektopické akumulaci dochází při přesycení skladovací kapacity adipocytů při nadměrném přívodu lipidů a sacharidů. Ektopicky uložené lipidy pak nejen vstupují do metabolických pochodů, ale ohrožují i přímo existenci buněk a funkčnost celých orgánů.

Nadbytek lipidových metabolitů negativně ovlivňuje funkci buněčných organel, především mitochondrií a endoplazmatického retikula a je spojena se zvýšenou produkcí reaktivních metabolitů kyslíku (ROS-reactive oxygen species), oxidačním stresem a aktivací zánětlivých procesů v metabolicky aktivních tkáních (Hopps 2009). Tento proces, označovaný jako lipotoxicita, může hrát důležitou úlohu v patogenezi inzulinové rezistence v kosterních svalech, nealkoholické jaterní steatóze, srdečním selhání a může vést k rozvoji renálních dysfunkcí (van Herpen 2008).

V negativních účincích lipotoxicity mohou hrát roli poruchy inzulinové signální kaskády, nerovnováha mezi příjmem nebo syntézou lipidů a jejich nízkou oxidací při fyzické inaktivitě, chronické zánětlivé procesy indukované aktivací rezidentních makrofágů neesterifikovanými mastnými kyselinami a oxidační stres (Heilbron and Campbell 2008). Bylo zjištěno, že oxidační stres a zánětlivé procesy korelují s postupně narůstající rezistencí tkání k účinkům inzulinu (Hopps 2009).

V kosterním svalu ektopicky uložené mastné kyseliny a jejich intermediální metabolity mohou hrát důležitou roli v patogenezi inzulinové rezistence tím, že ovlivňují přenos inzulinového signálu a transport glukózy (Corcoran 2007).

K ektopické akumulaci lipidů v játrech dochází při dietně indukovaném vysokém příjmu lipidů nebo *de novo* lipogenezi nad oxidací a sekrecí triglyceridů z jater ve VLDL částicích. Jaterní steatóza je spojena se zhoršeným metabolismem glukózy, mastných kyselin i lipoproteinů a manifestuje se poruchami glukoneogeneze, oxidace mastných kyselin a sekrece lipoproteinů (Fabbrini 2010).

V β -buněkách pankreasu vede zvýšený přívod lipidů k dysregulaci sekrece inzulinu. Mastné kyseliny mohou ovlivňovat expresi glukokinázy, glukózových transportérů GLUT2 a PPAR α receptorů, které mohou modulovat sekreci inzulinu. Zvýšený přívod mastných kyselin je rovněž příčinou apoptózy β -buněk (Kazdová 2003).

Přestože většina dosud publikovaných studií podporuje důležitou úlohu lipotoxicity v etiologii poruch provázejících metabolický syndrom, zůstávají mechanismy podmiňující asociaci dyslipidémie se zánětlivými procesy, oxidačním stresem a s inzulinovou rezistencí neobjasněny. V současné době není zcela jasné, zda zánětlivé procesy jsou příčinou inzulinové rezistence nebo zda jsou jen doprovodným jevem, jiných procesů, například oxidačního stresu. Nevyřešenou otázkou zůstávají i možnosti prevence a terapie lipotoxicity, zánětu a oxidačního stresu.

Literatura

1. Corcoran MP., Lamon-Fava S, Fielding RA. Am J Clin Nutr 2007; 85: 662-677.
2. Fabbrini E., Sullivan S., Klein S. Hepatology 2010; 51: 679-689.
3. DeFronzo RA. Diabetologia 2010; 53: 1270-1287.
4. Heinbron LK., Campbell LV. Curr Pharm Design 2008; 14: 1225-1230.
5. Hopps E., Noto D., Caimi G., Aversa MR. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2010; 20: 72-77.
6. Kazdova L., et al. Diabetology 2003; 45(Suppl 2): 228.
7. Van Herpen NA., Schrauwen-Hinderling VB. Physiol Behav 2008; 94: 231-241.
8. Park YW., Zhu S., Palaniappan L., et al. Arch Intern Med 2003; 163: 427-436.

Studie byla podpořena granty MZO 00023001, IAA 500110805 a P301/11/2418

NADVÁHA U MUŽOV STREDNÉHO VEKU V KORELÁCI S RIZIKOM VZNIKU METABOLICKÉHO SYNDRÓMU

OVERWEIGHT IN MIDDLE AGED MEN IN CORRELATION WITH RISK OF DEVELOPMENT OF METABOLIC SYNDROME

J. Koprovičová, D. Petrášová

Ústav experimentálnej medicíny LF UPJŠ Košice, Slovenská republika

Abstract

Metabolic syndrome (MS) or cardiometabolic syndrome is a growing epidemic in men and women worldwide and is characterized by specific combination of known CVD risk factors, including obesity, dyslipidemia, elevated blood pressure and impaired glucose tolerance. The present study was performed to compare the serum concentration of apolipoproteins (apoB, C-II and C-III) and lipids (TC, TG, LDL-C, nonHDL-C and HDL-C) and value of insulin resistance index (TG/HDL-C) in middle-aged men with overweight and elevated blood pressure (NV). Concentration of apoB-II, apoC-II and apoC-III and atherogenic lipids (TC, TG, LDL-C and nonHDL-C) were significantly elevated and concentration of HDL-C was significantly decreased in NV group versus Controls (K). According to our findings dyslipidemia with elevated value of insulin resistance index and elevated blood pressure in men with overweight is a strong risk of cardiovascular disease and metabolic syndrome.

Úvod

Metabolický syndróm alebo ináč kardiometabolický syndróm sa definuje ako spoločný výskyt porúch metabolizmu glycidov vrátane inzulínovej rezistencie, abdominálnej obezity, dyslipidémie spojenej so zvýšenou koncentráciou triacylglycerolov (TG) a zníženej koncentrácie cholesterolu HDL (HDL-CH), artériovej hypertenzie a ďalších rizikových faktorov podieľajúcich sa na zvýšení rizika ischemickej choroby srdca a diabetes mellitus 2. typu (Polsdorfer, 2101).

MS je diagnostifikovaný, ak sú prítomné aspoň 3 z nasledovných 5 podmienok:

- glykémia nalačno $\geq 6,1$ mmol/l
- krvný tlak $>130/85$ mm Hg
- TG $\geq 1,7$ mmol/l
- HDL-CH $\leq 1,3$ mmol/l u žien; $\leq 1,0$ mmol/l u mužov
- Obvod pása > 88 cm u žien; >102 cm u mužov.

K vyššie uvedeným podmienkam sa zarátava aj zvýšená koncentrácia malých denzných LDL častíc, ktoré ľahko podliehajú oxidácii a teda sú veľmi aterogenné (Miranda et al., 2005)

Cieľ štúdie

Zistiť mieru ohrozenia probandov mužského pohlavia s nadváhou z hľadiska rizika vzniku metabolického syndrómu

Materiál a metódy

Sledovali sme sérovú koncentráciu apolipoproteínov apoC-II, apoC-III, apoB₁₀₀ a z lipidov, koncentráciu celkového cholesterolu (TCH), triacylglycerolov (TG), cholesterolu - LDL (LDL-CH), cholesterolu nonHDL (nonHDL-CH), cholesterolu HDL (HDL-CH) a hodnotu aterogenného indexu inzulínovej rezistencie (TG/HDL-CH) v skupine N1=28 mužov stredného veku (48±7 rokov) s nadváhou (BMI=26–30 kg/m) a so zvýšeným priemerným

krvným tlakom ($TK \geq 130/90$ mm Hg) (NV). Do kontrolnej skupiny sme zaradili $N=21$ zdravých mužov so zrovnateľným vekovým priemerom (45 ± 8 rokov) s normálnou telesnou hmotnosťou ($BMI=23-25$ kg/m) s normálnym TK ($TK \leq 130/85$ mm Hg) (K).

Koncentráciu apoC-II a apoC-III sme určovali metódou RID pomocou japonských platô (Daiichi, Tokio). Koncentráciu apoB₁₀₀ sme stanovovali metódou EIA pomocou antisér a štandard nemeckej výroby (Behringwerke, Marburg). Koncentráciu lipidových parametrov (TCH, TG a HDL-CH) sme vyšetřovali pomocou setov českej výroby (Pliva Lachema, Brno), pričom HDL-CH sme izolovali precipitačne podľa Gidéza. Koncentráciu LDL-CH, nonHDL-CH a aterogenného indexu inzulínovej rezistencie TG/HDL-CH sme vypočítali. Získané výsledky sme štatisticky vyhodnotili χ^2 testom, výpočtom lineárnej regresie a pomocou štatistických programov ANOVA 1 a ANOVA 2.

Výsledky

Koncentrácie apoC-II, apoC-III, apoB₁₀₀, TCH, TG, LDL-CH, nonHDL-CH, HDL-CH a hodnotu aterogenného indexu TG/HDL-CH u probandov s nadváhou a so zvýšeným TK sme porovnávali s výsledkami v kontrolnej skupine u zdravých probandov bez nadváhy a bez hypertenzie. Výsledky vyjadrujeme graficky (grafy 1 – 9).

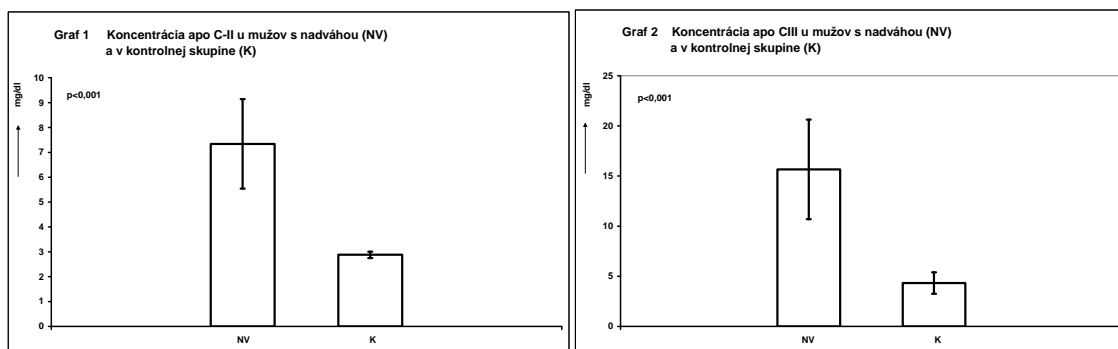
V skupine probandov s nadváhou a so zvýšenými hodnotami TK (NV) zistili sme štatisticky významne zvýšenú sérovú koncentráciu proaterogenných apolipoproteínov: apoC-II ($p < 0,001$), apoC-III ($p < 0,001$) ako aj apoB₁₀₀ ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolnou skupinou (K) (grafy 1 – 3).

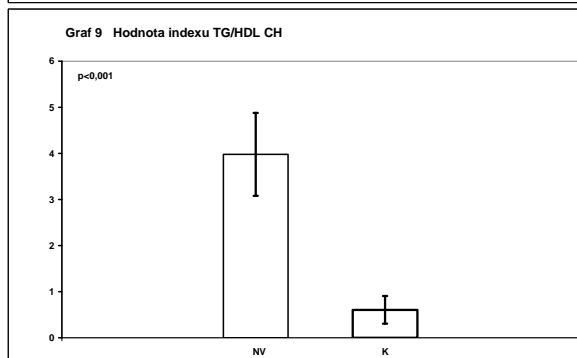
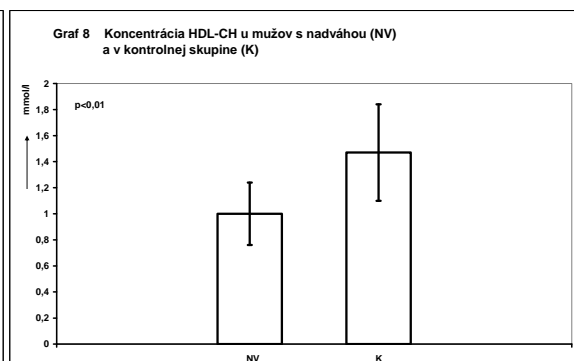
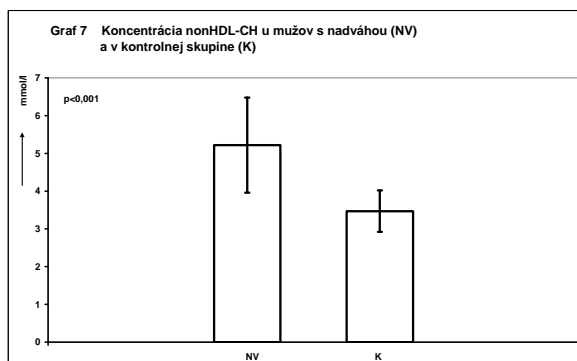
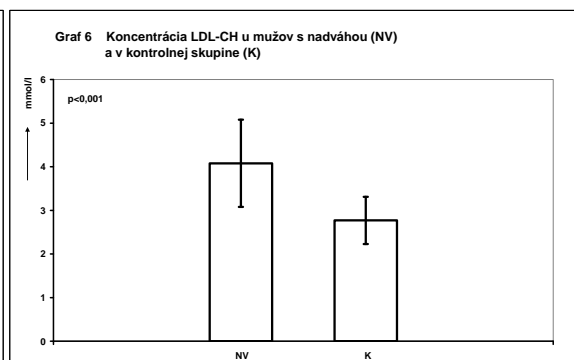
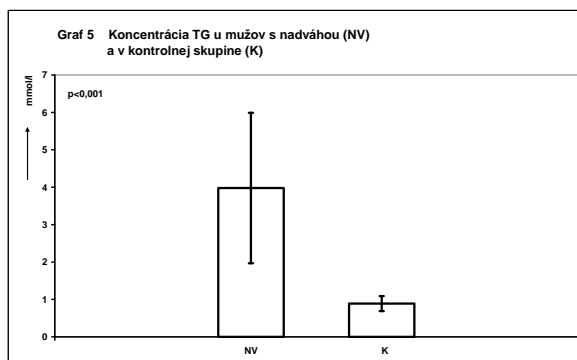
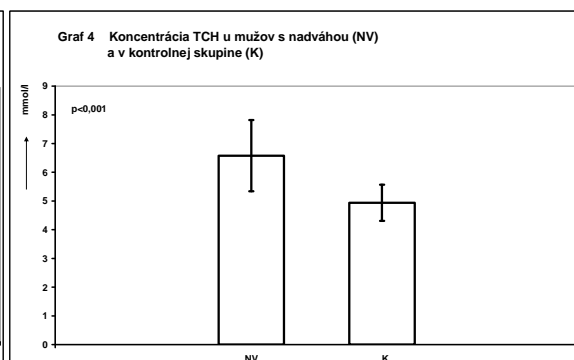
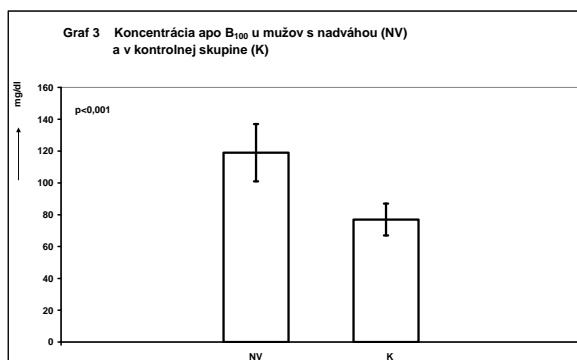
Z lipidových parametrov zistili sme signifikantne zvýšenú sérovú koncentráciu TCH ($p < 0,001$) a TG ($p < 0,001$) v skupine NV oproti kontrolnej skupine K (grafy 4 – 5).

Koncentrácia aterogennej LDL-CH ako aj veľmi aterogennej nonHDL-CH bola u nich taktiež značne zvýšená s identickou vysokou štatistickou významnosťou ($p < 0,001$) (grafy 6 – 7).

Dyslipidémiu potvrdzuje aj signifikantne znížená sérová koncentrácia HDL-CH ($p < 0,01$) u mužov s nadváhou (graf 8).

Významne zvýšená hodnota aterogenného indexu TG/HDL-CH dokazuje inzulínovú rezistenciu v skupine NV v porovnaní s kontrolnou skupinou K ($p < 0,001$) (graf 9).





Diskusia

Kardiovaskulárne ochorenia na báze predčasnej aterotrombózy sú v ostatných rokoch stále na čele morbidity a mortality v mnohých priemyselne vyspelých štátoch, žiaľ nevynímajúc ani Českú – ani Slovenskú republiku.

Problematika metabolického syndrómu (MS) v súčasnosti je tiež veľmi aktuálna, keďže podľa štatistických údajov WHO toto ochorenie postihuje minimálne jednu štvrtinu populácie priemyselne vyspelých štátov a dokonca u 50 – ročných až 40 %. Podľa údajov Národného cholesterolového edukačného programu (NCEP SR) diagnostické kritéria pre MS spĺňa 20,1

% slovenskej populácie s významne vyšším výskytom u žien (23,9 %) oproti mužom (15,9 %). Pričom prevalencia MS na Slovensku je porovnateľná s prevalenciou v európskej populácii iných krajín (Mokáň a spol., 2006).

Výsledky viacerých lipidologických štúdií poukazuje okrem lipidov aj na významné zmeny v metabolizme apolipoproteínov u chorých s MS. Sniderman a Faraj zistili, že vyššie riziko vzniku kardiovaskulárnych ochorení priamo súvisí so zníženou koncentráciou apo A-I a zvýšenou koncentráciou apo B. Dokonca uvedení autori doporúčajú rozšíriť kritéria pre definíciu MS o zvýšenú koncentráciu apoB a zníženú koncentráciu apo A-I (Sniderman and Fraj, 2007).

Závažnosť MS spočíva najmä v tom, že je hlavným predispozičným rizikovým faktorom aterotrombózy. Bolo totiž zistené, že u ľudí s MS sa až zdvojnásobí výskyt predčasnej aterotrombózy.

MS charakterizuje hypertriacylglycerolémia a nízka sérová koncentrácia HDL-CH.

ApoC-III je významným regulátorom metabolizmu lipoproteínov ktorý tesne koreluje s hypertriacylglycerolémiou a progresiou kardiovaskulárnych ochorení. Taktiež významne koreluje so spomaleným katabolizmom TG a TRLs. (Ooi et al., 2008).

Podľa mienky autorov talianskej štúdie, koncentrácia apoC-III často sa významne zvyšuje u ľudí s MS. Metabolizmus lipoproteínov bohatých na apoC-III a APOC3 polymorfizmus má relevantný impakt rizika kardiovaskulárnych ochorení u chorých s MS (Olivieri et al., 2008).

Naši probandi s nadváhou a hranične zvýšeným TK už spĺňajú kritéria pre MS, keďže okrem zistenej dyslipidémie majú aj významné zmeny v koncentrácii apoB a apoC-III.

Autori štúdie z USA považujú zvýšenú hodnotu indexu apoB/apoA-I z hľadiska kardiovaskulárneho rizika za nezávislý marker s lepšou výpovednou hodnotou, ako sú indexy cholesterolu (Enkhmaa et al., 2010).

Významným kardio-lipido-metabolickým rizikovým faktorom inzulínovej rezistencie je zvýšená hodnota indexu TG/HDL-C, ktorej hodnota často je vyššia najmä u obeznych ľudí. Významne zvýšenú hodnotu tohto indexu (CL50 % = 3,64) našli autori španielskej štúdie u obeznych žien. Zistili aj pozitívnu koreláciu medzi týmto indexom a BMI (Roa Barrios et al., 2009).

Kritéria pre významne zvýšenú hodnotu indexu inzulínovej rezistencie spĺňajú aj naši probandi s nadváhou v porovnaní s kontrolnou skupinou (CL50 % = 3,51; $p < 0,001$).

Záver

Uvedené koncentrácie lipidov a apolipoproteínov u našich probandov – mužov stredného veku s nadváhou a zvýšenými hodnotami TK ($\geq 140/90$) spĺňajú kritéria pre dyslipidémiu (\uparrow TG a \downarrow HDL-CH) a taktiež pre inzulínovú rezistenciu (\uparrow TG/HDL-CH). V konečnom dôsledku teda spĺňajú aj kritérium pre definíciu metabolického syndrómu.

Literatúra

1. Enkhmaa B., et al. Usefulness of apolipoprotein B/ apolipoprotein A-I ratio to predict coronary artery disease independent of the metabolic syndrome in African Americans. Am J Cardiol 2010; 106: 1264-1269.
2. Galajda P. Metabolický syndróm, kardiovaskulárne a metabolické riziká. Via pract 2007; 4: 5-9.
3. Miranda PJ., et al. Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology and mechanisms. Am Heart J 2005; 149: 33-41.
4. Mokáň M., et al. Prevalencia diabetes mellitus a metabolického syndrómu na Slovensku. Diabetes a obezita 2006; 6: 10-16.
5. Olivieri O., et al. Apolipoprotein C-III, metabolic syndrome and risk of coronary artery disease. J Lipid Res 2003; 44: 2374-2381.

6. Ooi EM., et al. Apolipoprotein C-III: understanding an emerging cardiovascular risk factor. Clin. Sci (Lond) 2008; 114: 611-624.
7. Polsdorfer R. Risk factors for obesity. In Aurorahealthcare, 2010 (online).
8. Roa Barrios M., et al. Relationship between the triglyceride/high density lipoprotein-cholesterol ratio, insulin resistance index and cardio-metabolic risk factors in women with polycystic ovary syndrome. Endocrinol Nutr 2009; 56: 59-65.
9. Sniderman AD., Faraj M. Apolipoprotein B, apolipoprotein A-I, insulin resistance and the metabolic syndrome. Curr OpinLipidol 2007; 18: 633-637.

Práca bola podporená projektmi: VEGA 1/0372/10 a VEGA 1/0456/11

NIACIN ZVYŠUJE SÉROVÉ HLADINY ADIPONEKTINU A OXIDACI MASTNÝCH KYSELIN VE SVALECH

NIACIN INCREASES SERUM LEVEL OF ADIPONECTIN AND FATTY ACID OXIDATION IN MUSCLE

H. Malínská, M. Maxová, O. Oliyarnyk, L. Kazdová

Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Úvod

Hypolipidemické účinky niacinu jsou již dlouho známy a jsou využívány při terapii aterogenní dyslipidémii zejména v kombinaci léčbě s fibráty nebo statiny (Carlson 2005, Žák 2006). Kyselina nikotinová (niacin) zlepšuje lipidový profil a její podávání snižuje morbiditu a mortalitu na kardiovaskulární onemocnění. Nověji se ukazuje, že pozitivní účinky niacinu mohou souviset s antitrombotickými, protizánětlivými a antioxidačními vlastnostmi (Florentin 2011).

Niacin je prekurzorem dvou esenciálních koenzymů – nikotinamidadenin-dinukleotidu (NAD) a nikotinamidadenin-dinukleotidfosfátu (NADP), které mohou být redukovány na NADH a NADPH. Účastní se tak oxidoredukčních reakcí, které jsou katalyzovány dehydrogenázami a oxidoreduktázami a ovlivňuje tak četné metabolické pochody (Bender 2003).

Vliv niacinu na lipidový metabolismus a tukovou tkáň

Recentní studie ukazují pravděpodobný pleiotropní efekt niacinu na tukovou tkáň (Linke et al 2009). Niacin jednak inhibuje lipolýzu v důsledku vazby na specifický receptor (Meyers 2004), která inhibuje adenylát cyklázu a vede k poklesu koncentrací c-AMP. Pokles koncentrací c-AMP deaktivuje hormon-senzitivní lipázu. Experimentální studie prokázaly také vliv na karnitinpalmitoyl transferázu a syntázu mastných kyselin. Mezi možné další mechanismy příznivého účinku niacinu na tukovou tkáň a inzulínovou senzitivitu může patřit zvýšení exprese a sekrece adiponektinu.

Podávání niacinu nejrychleji snižuje hladiny NEMK v důsledku inhibice lipolýzy. Jednorázové podání niacinu inhibuje v tukové tkáni uvolňování NEMK a vede k poklesu jejich koncentrací v cirkulaci. Lipolýza je inhibována zhruba 2 hodiny a poté se sérové koncentrace NEMK zvyšují nad původní hodnotu, což vysvětluje některé nepříznivé metabolické účinky kyseliny nikotinové. Ke snížení hladin triglyceridů po podání niacinu přispívá snížení syntézy triglyceridů v játrech jednak vzhledem k omezené dostupnosti substrátu a jednak v důsledku inhibice syntézy blokádou jaterní izoformy diacylglycerol acyltransferázy. Na snižování sekrece VLDL částic z jater, které přispívá ke snížení LDL cholesterolu, se podílí zpomalené sestavení částic VLDL z triglyceridů a apoB (Ganji et al 2003). K nejvýznamnějším účinkům niacinu však patří jeho schopnost zvyšovat hladiny HDL cholesterolu. Niacin brzdí katabolismus HDL částic v játrech blokádou specifických katabolických receptorů pro HDL částice, nezbytných pro reverzní transport cholesterolu. Snížené hladiny HDL-C jsou silným nezávislým kardiovaskulárním rizikovým faktorem zejména u pacientů s prediabetem a metabolickým syndromem. Epidemiologické studie ukazují, že zvýšení HDL-C o 0,03 mmol/l je spojeno s 2 – 4 % snížením incidence kardiovaskulárního onemocnění.

Nežádoucí účinky niacinu

Podávání niacinu u osob s metabolickým syndromem a diabetem 2. typu však není jednoznačně doporučováno pro některé možné negativní metabolické účinky (Bodor 2008). Podávání niacinu může zhoršovat glukózovou toleranci a vést ke zhoršení inzulínové

senzitivity s kompezatorním zvýšením sekrece inzulinu. Jiným negativním důsledkem niacinu je zvýšení kyseliny močové, pravděpodobně způsobené kompeticí mezi niacinem a kyselinou močovou, neboť obě látky jsou vylučovány stejným mechanismem. Možný je i hepatotoxický vliv v důsledku nedostatku methylových skupin, které se uplatňují v metabolismu niacinu. Je možné, že vysoké dávky niacinu povedou k nedostatku methylových skupin nezbytných pro remetylaci homocysteinu.

V poslední době se zvýšil zájem o studium účinku niacinu, neboť se na trh dostávají preparáty s řízeným nebo postupným uvolňováním, které snižují frekvenci negativních účinků. Nový preparát, Tredaptive, obsahuje vedle řízeného uvolňování také inhibitor PG D2 syntázy (Kamanna et al 2009), který brání nežádoucímu prokrvení pokožky (tzv. flush). Řada otázek týkajících se mechanismu účinku niacinu zůstává neobjasněna. Nejasná je otázka možného hepatotoxického působení, nedostatečné jsou rovněž informace o ektopickém ukládání lipidů a ovlivnění inzulinové senzitivity tkání.

Cíl

Cílem práce proto bylo sledovat vliv podávání niacinu na dyslipidémii a inzulinovou rezistenci v tukové a svalové tkáni u neobézního modelu metabolického syndromu.

Metodika

Pokusy byly provedeny na dospělých samcích kmene hereditárně hypertriglyceridemických potkanů (HHTg), u kterých jsou přítomny další poruchy asociované s metabolickým syndromem, zejména inzulinová rezistence a nealkoholická jaterní steatóza. Niacin byl podáván v dietě v dávce 60mg niacinu/kg t.hm. po dobu 6 týdnů, u akutního podání v dávce 40mg/kg t.hm. intragastricky. Pro stanovení sérových koncentrací glukózy, triglyceridů a NEMK byly použity komerčně dostupné kity Pliva Lachema a Roche Diagnostic. Hladiny inzulinu a adiponektinu byly stanoveny ELISA kity (Mercodia Švédsko, B-Bridge USA). Inzulinová senzitivita byla sledována *in vitro* podle inkorporace radioaktivně značené ¹⁴C-glukózy do lipidů v tukové tkáni nebo glykogenu ve svalu. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin v membránových fosfolipidech bylo stanoveno plynovou chromatografií s FID detektorem.

Výsledky

Akutní podání niacinu snížilo sérové hladiny triglyceridů ($P < 0,01$) i koncentraci NEMK ($P < 0,01$) po dobu 60 minut, v dalších intervalech se však koncentrace sérových lipidů zvýšily. Sledování koncentrací lipidů v průběhu dne po jednorázovém intragastrickém podání niacinu ukázalo mírně zvýšené koncentrace triglyceridů a NEMK hodnocené jako plocha pod křivkou. K významným nálezům patří zvýšení hladiny HDL-C o 15% ($P < 0,02$) u HHTg potkanů po podání niacinu v dietě. Sérové koncentrace cholesterolu nebyly podáváním niacinu ovlivněny. Naproti tomu podáváním niacinu zvyšovalo koncentraci triglyceridů ($P < 0,05$) a cholesterolu ($P < 0,05$) v játrech. Senzitivita tukové ani svalové tkáně k účinku inzulinu nebyla ovlivněna podáváním niacinu. Rovněž glukózová tolerance měřená v průběhu OGTT nebyla podáváním niacinu ovlivněna. Naopak zvýšení hladin adiponektinu v séru ($P < 0,05$) a mírné snížení triglyceridů ve svalu ($P < 0,05$) po podání niacinu by mohly přispět ke zlepšení inzulinové senzitivity. Měření oxidace mastných kyselin podle inkorporace ¹⁴C-palmitátu do CO₂ ukázalo, že v mechanismu účinku niacinu by se mohlo uplatnit zvýšené oxidační využití mastných kyselin ve svalu (208 ± 7 vs 154 ± 15 nmol/g/2hod, $P < 0,01$).

Změny v zastoupení jednotlivých mastných kyselin v membránových fosfolipidech mohou mít důsledky pro metabolické poruchy spojené s inzulinovou rezistencí, zejména mohou ovlivnit inzulinovou senzitivitu. Podání niacinu prokázalo mírně příznivý vliv na profil mastných kyselin (tabulka 2). Výrazné snížení kyseliny palmitoolejové (16:1n7) a $\Delta 9$

desaturázy ($0,048 \pm 0,01$ vs $0,072 \pm 0,01$ %mol, $P < 0,01$) mohou přispět ke zlepšení inzulínové senzitivity. Další nezávislé prediktory inzulínové senzitivity a metabolického syndromu – kyselina dihomog- γ -linolenová a $\Delta 5$ desaturáza nebyly podáváním niacinu ovlivněny.

Tab. 1 – Vliv podávání niacinu na parametry sacharidového a lipidového metabolismu

	HHTg	HHTg + niacin	P<
sérové triglyceridy	5,24±0,44	4,29±0,46	0,05
glykémie	4,65±0,13	5,16±0,31	n.s.
inzulin	0,105±0,029	0,091±0,012	n.s.
adiponektin	5,01±0,61	9,19±0,25	0,05
NEMK	0,933±0,082	0,973±0,087	n.s.
cholesterol	1,59±0,05	1,62±0,03	n.s.
HDL-cholesterol	1,16±0,04	1,30±0,06	0,05
triglyceridy v játrech	8,62±0,44	10,84±0,70	0,05
cholesterol v játrech	6,10±0,21	6,63±0,16	0,01
triglyceridy v myokardu	2,85±0,21	3,51±0,19	0,05
triglyceridy ve svalu	4,25±0,35	3,89±0,58	0,05

Hodnoty udávají průměr \pm SE, počet zvířat ve skupině 6.

Jednotky: sérové triglyceridy, glykémie, NEMK, HDL-cholesterol - mmol/l; inzulin - nmol/l; tkáňové triglyceridy a cholesterol - μ mol/g, adiponektin - μ g/ml

Tab 2 – Vliv podávání niacinu na spektrum FA v membránových fosfolipidech séra

Mastné kyseliny	HHTg	HHTg + niacin	P
14 : 00	0,417 \pm 0,040	0,157 \pm 0,043	< 0,001
16 : 00	27,667 \pm 1,110	21,629 \pm 1,619	< 0,02
18 : 00	19,633 \pm 0,465	25,129 \pm 0,905	< 0,001
20 : 00	0,00 \pm 0,00	0,057 \pm 0,020	n.s.
Σ SFA	47,717 \pm 1,292	46,971 \pm 0,830	n.s.
16 : 1n7	2,000 \pm 0,126	1,043 \pm 0,139	< 0,001
18 : 1n7	3,117 \pm 0,130	2,657 \pm 0,166	n.s.
18 : 1n9	8,067 \pm 0,196	5,514 \pm 0,466	< 0,001
20 : 1n9	0,067 \pm 0,021	0,100 \pm 0,00	n.s.
Σ MUFA	13,250 \pm 0,283	9,314 \pm 0,660	< 0,001
18 : 2n6	22,467 \pm 0,255	23,829 \pm 0,644	n.s.
18 : 3n6	0,100 \pm 0, 0	0,100 \pm 0,090	n.s.
20 : 2n6	0,433 \pm 0,033	0,457 \pm 0,048	n.s.
20 : 3n6	1,617 \pm 0,158	1,643 \pm 0,160	n.s.
20 : 4n6	12,017 \pm 0,780	14,557 \pm 0,811	< 0,05
22 : 4n6	0,100 \pm 0,00	0,157 \pm 0,020	< 0,05
Σ n6 PUFA	36,733 \pm 0,891	40,743 \pm 1,006	< 0,02
18 : 3n3	0,150 \pm 0,034	0,157 \pm 0,030	n.s.
20 : 5n3	0,400 \pm 0,037	0,329 \pm 0,042	n.s.
22 : 5n3	0,717 \pm 0,119	1,014 \pm 0,142	n.s.
22 : 6n3	1,067 \pm 0,123	1,586 \pm 0,202	n.s.
Σ n3 PUFA	2,333 \pm 0,285	3,086 \pm 0,385	n.s.

Hodnoty udávají průměr \pm SE, počet zvířat ve skupině 6.

Jednotky: % mol

Diskuze

Výrazné zvýšení sérových hladin adiponektinu spolu se snížením koncentrací triglyceridů ve svalu a mírným zlepšením zastoupení mastných kyselin ve fosfolipidech by mohly přispět ke zlepšení inzulínové senzitivity. Tyto změny pozorované u HHTg potkanů však nebyly spojeny se zlepšením senzitivity svalové ani tukové tkáně. Je možné, že se spíše jedná o kompenzační mechanismus proti nežádoucímu zvýšení triglyceridů a cholesterolu v játrech, pozorované u HHTg potkanů. Zvýšení adiponektinu po podání niacinu bez ovlivnění inzulínové senzitivity bylo pozorováno i v klinických studiích (Linke et al 2009).

Vedle zvýšení adiponektinu po podání niacinu byly popsány i zvýšené hladiny leptinu, zjištěny byly také protizánětlivé účinky niacinu v aterosklerotickém procesu (Yu a Zhao 2006) a pokles tendence k trombózám (Westphal a Luley 2008). V klinické studii u pacientů se zhoršenou glukózovou tolerancí niacin příznivě ovlivnil morfologii subkutánní tukové tkáně, když snížil velikost adipocytů (Linke et al 2009).

Závěr

Výsledky ukazují, že v přítomnosti poruch provázejících metabolický syndrom podávání niacinu může zlepšit dyslipidémii a zvýšit hladiny HDL cholesterolu. Současně jsme neprokázali, že by podávání niacinu zhoršovalo inzulínovou senzitivitu a glukózovou toleranci. V mechanismu účinku niacinu se může uplatnit zvýšená oxidace mastných kyselin ve svalu a zvýšená sekrece adiponektinu z tukové tkáně.

Literatura

1. Bender DA. Cambridge University Press, 2003, p. 488.
2. Bodor ET., Offermanns S. Brit J Pharmacol 2008; 153: S68-S75.
3. Carlson LA. J Int Med 2005; 258: 94-114.
4. Florentin M., Liberopoulos EN., Mikhailidis DP., Elisaf MS. Curr Vasc Pharmacol Feb. 2011.
5. Ganji SH., Kamanna VS., Kashyap ML. J Nutr Biochem 2003; 14: 298-305.
6. Kamanna VS., Ganji SH., Kashyap ML. Int J Clin Pract 2009; 63: 1369-77.
7. Linke A., Sonnabend M., Fasshauer M., et al. Atherosclerosis 2009; 205: 207-213.
8. Meyers CD., Kamanna VS., Kashyap ML. Curr Opin Lipidol 2004; 15: 659-665.
9. Westphal S., Luley C. Atherosclerosis 2008; 198: 179-83.
10. Yu B., Zhao S. Medical Hypotheses 2007; 69: 90-94.
11. Žák A., Zeman M., Vecka M., Tvrzická E. Cas Lek Ces 2006; 145: 825-831.

Studie byla podpořena granty NS 9757-4 a IAA 500110805.

VLIV SPONTÁNNÍ FYZICKÉ AKTIVITY NA PARAMETRY METABOLICKÉHO SYNDROMU

M. Maxová, H. Malínská, H. Seidlová, J. Urbanová, L. Kazdová

IKEM, Praha

Úvod

Obezita a fyzická inaktivita jsou rizikovými faktory pro poruchy, které jsou souborně nazývány metabolický syndrom. Toto onemocnění postihuje v rozvinutých zemích až čtvrtinu populace a mezi jeho typické složky patří inzulinová rezistence, hyperglykémie, hypertenze a dyslipidémie, která má klíčovou úlohu v rozvoji metabolických poruch, neboť s ní je spojeno zvýšené ukládání triacylglycerolů (TAG) a jejich metabolitů mimo tukovou tkáň (tzv. ektopické ukládání). Přítomnost metabolického syndromu je spojena s pěti- až devítinásobným rizikem vzniku diabetu 2. typu a s dvoj- až trojnásobným zvýšením kardiovaskulární mortality (Park et al., 2003). Je prokázáno, že u obézních jedinců již mírně zvýšená fyzická aktivita a následný úbytek tělesné hmotnosti vedou ke snížení těchto rizik. Současné studie se zabývají tím, zda je pozitivní účinek způsoben spíše snížením tělesné hmotnosti způsobené fyzickou aktivitou nebo snížením energetického příjmu, resp. úpravou stravovacího režimu. Mechanismy, jimiž fyzická aktivita zlepšuje citlivost tkání k účinku inzulinu nejsou dosud přesně objasněny.

Cílem experimentu bylo sledovat u neobézního kmene hereditárně hypertriglyceridémických potkanů (HHTg) pozitivní účinky vyšší spontánní fyzické aktivity na negativní účinky vysokého příjmu sacharózy.

Metody

Pokus byl proveden na dospělých (3-měsíčních) samcích HHTg potkanů (kontrolní skupina: $n = 6$, pokusná skupina: $n = 7$). Neobézní kmen HHTg potkanů vykazuje vedle poruch lipidového metabolismu i výraznou rezistenci tkání k účinku inzulinu, hyperinzulinémií a mírnou hypertenzi. Tyto metabolické abnormality jsou u HHTg potkanů potencovány dietou s vysokým podílem sacharózy nebo fruktózy. Všem potkanům byl po dobu 3 týdnů podáván 20%ní roztok sacharózy (vysokosacharózová dieta) ve formě nápoje *ad libitum*, stejně jako standardní peletovaná dieta. Pokusná skupina byla rozmístěna po jednom zvířeti do speciálních klecí s kolovými pohybovými trenažery (Rat Activity Wheel and Cage, fa Panlab, Harvard Apparatus) tzv. běhátky ($r = 16$ cm). Potkani měli možnost kdykoliv buď běhat nebo využívat standardní plochu klece k odpočinku. Trenažery zaznamenávaly v průběhu experimentu počet otáček v denní i noční hodinu pomocí magnetického čidla, které bylo trvale napojeno na speciální počítačový program. Kontrolní skupina byla umístěna v klecích (2 potkani/1 klec) bez možnosti nadstandardní pohybové aktivity.

Glukózová tolerance byla sledována pomocí orálního glukózového tolerančního testu (OGTT) po intragastrickém podání glukózy (3g/100g t.hm.) po nočním lačnění. Hladiny jednotlivých látek byly hodnoceny v čase 0, 30, 60, 120 min a dále byla vypočítána plocha pod křivkou ($AUC_{0-120min}$). Glykémie a hladiny triglyceridů byly stanoveny v séru pomocí analytických souprav Pliva-Lachema (ČR). Sérové koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) byly stanoveny komerčně dostupným kitem fa Roche Diagnostic (Germany). Koncentrace inzulinu v séru byly měřeny pomocí komerčního kitu Rat Insulin ELISA (Mercodia, Uppsala, Sweden). Adiponektin byl stanoven kitem Mouse/Rat Adiponectin ELISA (B-Bringer Int., Inc.). Ke stanovení koncentrace triacylglycerolů v játrech, resp. svalech byla tkáň rozdracena v kapalném dusíku a extrahována ve směsi chloroformu a

methanolu. Po přidání 2%KH₂PO₄ byla směs centrifugována. Po odpaření byl obsah triacylglycerolů stanoven pomocí analytické soupravy (Pliva–Lachema, Brno, ČR).

Senzitivita tkání k účinku inzulínu byla sledována *ex vivo* při inkubaci tkáně bez inzulínu a s inzulínem (250 µU/ml) podle inkorporace ¹⁴C-U-glukózy do glykogenu kosterního svalu, resp. tukové tkáně. Lipolýza v tukové tkáni byla sledována podle uvolňování NEMK *in vitro* při inkubaci tkáně bez adrenalinu nebo s adrenalinem (250µg/ml). Oxidace mastných kyselin byla stanovena *in vitro* podle inkorporace ¹⁴C–palmitátu do CO₂.

Výsledky a diskuse

Mezi sledovanými skupinami nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ve spotřebě vysoko-sacharóзовého nápoje (44,5 vs 47 ml/den/potkana) ani standardní diety (17 vs 20 g/den/potkana).

Spontánní pohybová aktivita výrazně snižovala u HHTg potkanů v průběhu orálního glukózového tolerančního testu i v sytém stavu hladiny sérových TAG. Hladiny inzulínu nebyly u sledovaných skupin rozdílné, glykémie byla po fyzické aktivitě mírně zvýšená. V séru fyzicky aktivních potkanů byly překvapivě zjištěny o 47 % nižší hladiny adiponektinu než u zvířat neaktivních.

Zvýšená fyzická aktivita snížila u potkanů konzumujících vysoké množství sacharózy po třech týdnech nejen celkovou tělesnou hmotnost, ale zejména i hmotnost epididymální a perirenální tukové tkáně, které jsou ukazatelem viscerální obezity (tab. 1). V tabulkách jsou u vybraných parametrů pro srovnání uváděny i standardní hodnoty metabolismu HHTg potkanů bez ovlivnění dietou a fyzickou aktivitou.

Tabulka 1

	HHTg	HHTg+VSD	HHTg+VSD + fyz.aktivita	p	
Celková tělesná hmotnost (g)	347 ± 10,2	441 ± 13	386 ± 13	0,04	
Hmotnost epididymální tukové tkáně (g/100g t.hm)	-	2,06 ± 0,04	1,22 ± 0,14	0,001	
Hmotnost perirenální tukové tkáně (g/100g t.hm)	-	2,30 ± 0,06	1,27 ± 0,19	0,001	
Glykémie (mmol/l)	4,79 ± 0,27	4,90 ± 0,01	6,20 ± 0,27	0,003	
TAG (mmol/l)	7,20 ± 1,38	10,07 ± 1,82	5,71 ± 1,41	0,05	
NEMK (mmol/l)	0,47 ± 0,02	0,49 ± 0,15	0,41 ± 0,03	N.S.	
Inzulin (nmol/l)	0,25 ± 0,02	0,30 ± 0,04	0,38 ± 0,05	N.S.	
Adiponektin (µg/ml)	-	6,45 ± 0,56	3,42 ± 0,22	0,05	
OGTT	Glykémie - lačný stav	4,49 ± 0,10	5,83 ± 0,13	6,79 ± 0,18	0,007
	Glykémie - 60. minuta	6,81 ± 0,11	7,69 ± 0,08	7,72 ± 0,49	N.S.
	TAG - lačný stav	5,53 ± 0,98	7,82 ± 1,03	4,13 ± 0,79	0,05
	TAG - 60. minuta	3,97 ± 0,90	6,88 ± 0,60	4,36 ± 1,03	0,05
	NEMK - lačný stav	2,16 ± 0,06	2,17 ± 0,17	2,17 ± 0,05	N.S.
	NEMK - 60. minuta	1,60 ± 0,03	1,20 ± 0,01	1,47 ± 0,08	0,01

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SE

p ... statistická významnost rozdílu mezi skupinou HHTg s vysokosacharóзовou dietou (VSD) a skupinou HHTG s VSD a fyzickou aktivitou

V další části experimentu byly provedeny inkubační pokusy, které měly za cíl sledovat *in vitro* senzitivitu tkání k účinku inzulínu.

Bílá tuková tkáň fyzicky aktivních potkanů obsahovala o 31 % více bílkovin než u neaktivních potkanů, což ukazuje, že tkáň obsahovala adipocyty o menší velikosti, které jsou metabolicky aktivnější. Lipogeneze sledovaná podle inkorporace ^{14}C -U-glukózy do tukové tkáně za bazálních nebo inzulínem stimulovaných podmínek nebyla u jednotlivých skupin rozdílná. Uvolňování NEMK z tukové tkáně po stimulaci adrenalinem bylo u fyzicky aktivních potkanů významně zvýšené. Citlivost kosterních svalů k účinku inzulínu nebyla u sledovaných skupin rozdílná (tab. 2).

Zvýšená pohybová aktivita výrazně snižovala oxidaci mastných kyselin jak v kosterním svalu, tak v hnědé tukové tkáni. Inkorporace ^{14}C -palmitátu byla po 3-týdenní fyzické aktivitě ve svalech nižší o 42,4 % a v hnědé tukové tkáni o 40,3 % než u neaktivních zvířat.

Tabulka 2

INKUBAČNÍ POKUSY			
Epididymální tuková tkáň			
	HHTg+VSD	HHTg+VSD + fyz.aktivita	p
Obsah bílkovin (%)	1,38 ± 0,07	2,01 ± 0,11	0,004
Lipogeneze - bazální	355 ± 11	371 ± 50	N.S.
(nmol gl/g/2h) - inzulínem stimulovaná	640 ± 312	585 ± 106	N.S.
Lipolýza - bazální	1,26 ± 0,36	1,85 ± 0,18	N.S.
($\mu\text{mol/g}$) - adrenalinem stimulovaná	2,13 ± 0,58	4,35 ± 0,61	0,05
Kosterní sval (<i>diaphragma</i>)			
	HHTg+VSD	HHTg+VSD + fyz. aktivita	p
Glykogeneze - bazální	39,5 ± 8,7	32,1 ± 7,1	N.S.
(nmol gl/g/2h) - inzulínem stimulovaná	56,3 ± 6,2	46,8 ± 6,8	N.S.
Oxidace MK (nmol /g/2h) (inkorporace palmitátu do CO_2)	83,2 ± 9,3	55,8 ± 7,0	0,05
Hnědá (interscapulární) tuková tkáň			
	HHTg+VSD	HHTg+VSD + fyz.aktivita	p
Oxidace MK (nmol /g/2h) (inkorporace palmitátu do CO_2)	57,1 ± 1,4	34,1 ± 7,9	0,02

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SE

p ... statistická významnost rozdílu mezi skupinou HHTg s vysokosacharózovou dietou (VSD) a skupinou HHTG s VSD a fyzickou aktivitou

Příznivým výsledkem bylo zjištění, že většina sledovaných tkání u fyzicky aktivních potkanů obsahovala méně TAG než u zvířat fyzicky neaktivních. Spontánní fyzická aktivita snižovala v kosterních svalech (*m. gastrocnemius*) o 30 % obsah TAG, v játrech o 34 % a v myokardu snižovala obsah TAG dokonce o 40 %. Tyto výsledky ukazují na nižší ektopické ukládání lipidů při vyšší fyzické aktivitě (viz tab.3).

Tabulka 3

OBSAH TAG VE TKÁNÍCH				
	HHTg	HHTg+VSD	HHTg+VSD + fyz.aktivita	p
Myokard ($\mu\text{mol/g}$)	3,12 \pm 0,11	3,39 \pm 0,18	2,24 \pm 0,21	0,01
Játra ($\mu\text{mol/g}$)	15,13 \pm 0,51	18,65 \pm 1,90	12,25 \pm 1,07	0,05
Kosterní sval ($\mu\text{mol/g}$)	2,50 \pm 0,21	2,98 \pm 0,75	2,09 \pm 0,28	N.S.

Hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm SE

p ... statistická významnost rozdílu mezi skupinou HHTg s vysokosacharózovou dietou (VSD) a skupinou HHTG s VSD a fyzickou aktivitou

Úroveň spontánní fyzické aktivity potkanů v kolových trenažerech byla $5,24 \pm 0,74$ km/den. Zvýšená fyzická aktivita byla spojena se sníženým množstvím spotřeby standardní diety ($r = -0,88$) a zároveň s nižší hmotností viscerální tukové tkáně ($r = -0,54$), se sníženým ektopickým ukládáním lipidů a s vyšší úrovní lipolýzy ($r = 0,51$).

Pozitivní účinek fyzické aktivity se u HHTg potkanů na vysokosacharóze dietě jednoznačně projevil jednak ve schopnosti redukce viscerální adipozity a jednak ve snižování koncentrací triacylglycerolů v cirkulaci i ve tkáních, což ukazuje na snížení rizika inzulínové rezistence. V humánních studiích, které sledují účinky vyšší tělesné aktivity na metabolické parametry se obvykle uvádí zlepšení inzulínové senzitivity v důsledku zvýšené oxidace lipidů. Naše výsledky oxidace MK v tukové i svalové tkáni ukazují opačnou tendenci. Možnou hypotézou, která vyžaduje další podrobnější zkoumání je to, že oxidace MK po fyzické aktivitě klesla v důsledku nedostatku substrátu, tzn. triacylglycerolů. Studie u lidí bývají krátkodobé a intenzita fyzické aktivity obvykle jen mírná, zatímco v našem dlouhodobém experimentu zvířata pravidelně a velmi intenzivně běhala každý den. Je možné, že u HHTg potkanů zvýšená fyzická aktivita způsobila nejprve výrazně zvýšenou oxidaci lipidů, následně významné snížení TAG v cirkulaci i ve tkáních a pak když došlo ke značnému poklesu TAG, klesla i úroveň oxidace MK. Navíc - modelem našeho experimentu byl neobézní kmen HHTg potkanů, zatímco v humánních studiích jsou předmětem zkoumání jedinci s obezitou nebo nadváhou, u kterých je snahou snížit nadbytečnou tělesnou adipozitu a u nichž i po fyzické aktivitě zůstávají tukové rezervy. Cílem naší práce bylo sledovat, do jaké míry může vyšší spontánní aktivita zmírňovat negativní dopady zvýšené konzumace sacharózy, jejíž spotřeba celosvětově dramaticky stoupá a zvyšuje incidenci nejen obezity, ale zároveň i diabetu 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění.

Závěr

Výsledky experimentu ukazují, že vyšší spotněnní pohybová aktivita u hereditárně hypetriglyceridémických potkanů zmírňovala některé negativní důsledky konzumace sacharózy. Fyzická aktivita snižovala zejména ektopické ukládání lipidů, které hraje důležitou úlohu v patogenezi inzulínové rezistence.

Literatura

Park YW., Zhu S., Palaniappan L., et al. Arch Intern Med 2003; 163: 427-436.

Poděkování: Studie byla podpořena MZO 00023001

TRANSGENIC EXPRESSION OF THE TRANSCRIPTION FACTOR NRF2 AMELIORATES OXIDATIVE STRESS AND METABOLIC SYNDROME IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

O. Oliyarnyk¹, M. Maxova¹, H. Seidlova¹, J. Urbanova¹, L. Kazdova¹, V. Zidek², V. Landa², M. Pravenec²

¹Department of Metabolism and Diabetes, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

²Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic., Prague, Czech Republic

Abstract

Nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (*Nrf2* or *Nfe2l2*) is a key transcription factor responsible for constitutive and inducible expression of ARE-regulated genes of antioxidant enzymes. To test the role *Nrf2* in the pathogenesis of metabolic syndrome, we derived a transgenic line of the spontaneously hypertensive rat (SHR) overexpressing *Nrf2* cDNA. The *Nrf2* transgene was significantly expressed in multiple tissues which was associated with increased activities of antioxidant enzymes and reduced lipid peroxidation. TBARS levels were significantly reduced compared to SHR controls in plasma (1.070 ± 0.101 vs. 1.701 ± 0.110 nmol/ml, $p < 0.001$), liver (0.96 ± 0.10 vs. 1.64 ± 0.17 nmol/mg, $p < 0.05$), and renal cortex (0.55 ± 0.04 vs. 0.69 ± 0.05 nmol/mg, $p < 0.05$). Transgenic rats exhibited increased basal (19.9 ± 2.3 vs. 36.3 ± 4.4 nmol gl./mg prot./2h, $p < 0.01$), insulin stimulated lipogenesis (90 ± 17 vs. 43 ± 6 nmol gl./mg prot./2h, $p < 0.05$) and adrenalin stimulated lipolysis (5.2 ± 0.7 vs. 3.2 ± 0.6 μ mol/g NEFA, $p < 0.05$) which suggests higher metabolic activity of adipose tissue. These findings provided evidence that *Nrf2* overexpression ameliorates oxidative stress and improves several components of the metabolic syndrome.

It is widely accepted that oxidative stress plays a causative role in the pathogenesis of metabolic syndrome. Understanding the molecular pathway(s) of antioxidant genes regulation is important for developing antioxidant-inducing agents for the intervention of complications associated with metabolic syndrome. Nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (*Nrf2* or *Nfe2l2*) is a key molecule in the regulation of endogenous antioxidant and detoxifying enzymes and the cysteine/glutamate transporter involved in the biosynthesis of important intracellular antioxidant - glutathione (GSH) [1].

Under basal resting conditions, *Nrf2* is sequestered in the cytoplasm by the cytoskeleton-associated, Kelch-like ECH-associated protein 1 (*Keap1*). *Keap1* functions as a negative regulator of *Nrf2* by promoting ubiquitination and proteasomal degradation of *Nrf2*[13] M. Furukawa and Y. Xiong, BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase, Mol. Cell. Biol. 25 (2005), pp. 162–171. Upon stimulation of cells with free radicals, the reactive cysteine (Cys273, Cys288 and Cys 297) residues within *Keap1* undergo oxidation and form an intramolecular disulfide bonds. *Nrf2* detaches from *Keap1*, translocates into the nucleus and forms a heterodimer with a small *Maf* (*sMaf*) protein. The *Nrf2*–*sMaf* dimer then binds to antioxidant response element (ARE), a cis-acting DNA regulatory element with a core nucleotide sequence of 5'-GTGACNNNGCN-3', localized in the promoter region of many genes coding for antioxidant enzymes (superoxide dismutase - SOD, glutathione peroxidase - GSH-Px, heme oxygenase HO-1, glutathione syntase, γ -glutamyl cysteine ligase thioredoxin reductase 1, and catalase) and phase II detoxifying enzymes (glutathione S-transferases-GST and UDP-glucuronyltransferases) and thus stimulates their expression [2].

Nrf2 knockout mice show a deficiency in this coordinated gene regulatory program and have a higher susceptibility to oxidative stress and chemical carcinogenesis, are highly prone

to developing steatohepatitis/fatty liver when fed a special diet deficient in methione and choline. In addition, *Nrf2* function is dependent on diet. For example Yu et al showed that nuclear content of *Nrf2* in adipose tissue was reduced in mice by high fat diet feeding, associated with increased *Keap1* mRNA expression and decreased expression of antioxidant enzymes (haem oxygenase-1 and SOD), increased protein oxidation and decreased plasma GSH:GSSG ratio [3].

Although many studies report *Nrf2* induced expression of antioxidant enzymes, most experiments have been done in vitro or using *Nrf2* knockout mice and limited information is available about the effect of *Nrf2* on antioxidant enzymes activity. We derived a new transgenic line of the spontaneously hypertensive rat (SHR) overexpressing *Nrf2* and determined the activity of the most important antioxidant enzymes: SOD, GSH-Px, glutathione reductase (GR), GST, concentration of GSH and lipid peroxidation products - conjugated dienes and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). These parameters were measured in plasma, liver, myocardium and renal cortex - tissues mostly damaged by metabolic disorders and hypertension in SHR rats.

Oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of several components of the metabolic syndrome. In the current study, we investigated the effect of *Nrf2* overexpression on parameters of oxidative stress in relation to glucose and lipid metabolism in the SHR.

We derived a transgenic line of the SHR rats by microinjecting zygotes with the mix of the Sleeping Beauty (SB) construct containing mice *Nrf2* cDNA under control of the CAGGS universal promoter and the SB100X transposase (referred to as the SHR-*Nrf2* transgenic rats). Control group comprised age-matched nontransgenic SHR. Antioxidant enzymes activities were detected using kits of Cayman Chemicals, MI, USA, concentrations of GSH, conjugated dienes and TBARS were measured spectrophotometrically according to previously described methods [for review see 4].

Insulin sensitivity of muscle and adipose tissue was measured in vitro without or with insulin (250 μ U/ml) according to basal and insulin-stimulated 14 C-U-glucose incorporation into diaphragm glycogen and TAG respectively. The rate of lipolysis was determined by NEFA release under basal and adrenalin stimulated conditions according to incorporation of 14 C-palmitate to CO_2 .

Activity of antioxidant enzyme SOD increased only in renal cortex of the SHR-*Nrf2* transgenic rats in comparison to SHR controls (0.060 ± 0.004 vs 0.039 ± 0.003 U/mg protein, $p < 0.01$). The activity of GSH-dependent enzymes, GSH-Px and GST, was more influenced by *Nrf2* overexpression. GSH-Px was activated in plasma, liver and myocardium in SHR-*Nrf2*, GST- in liver, myocardium and renal cortex (Table 1). The activity of GSH-regenerating enzyme GR was elevated in liver but concentration of GSH remained unchanged. It could be ascribed to the transport of GSH to other tissues which is evidenced by increased plasmatic GSH concentration. In renal cortex such GR activity as GSH concentration were elevated. The activity of catalase was increased in all investigated tissues. Induction of the antioxidant enzymatic system contributed to ameliorated lipid peroxidation. Although concentration of intermediate lipoperoxidation products conjugated dienes, was reduced only in liver (28 ± 2 vs 36 ± 3 nmol/mg, $p < 0.05$), the level of final products, the TBARS, was reduced in plasma, liver and renal cortex.

Transgenic rats exhibited increased both basal (19.9 ± 2.3 vs. 36.3 ± 4.4 nmol gl./mg prot./2h, $p < 0.01$) and insulin stimulated lipogenesis (90 ± 17 vs. 43 ± 6 nmol gl./mg prot./2h, $p < 0.05$) and elevated adrenalin stimulated lipolysis (5.2 ± 0.7 vs. 3.2 ± 0.6 μ mol/g NEFA, $p < 0.05$). *Nrf2* overexpression had no effects on plasma glucose and TAG concentrations, (data not shown) but increased NEFA levels (0.527 ± 0.025 vs 0.310 ± 0.018 mmol/l, $p < 0.01$). The level of TAG were reduced in myocardium in transgenic rats (1.411 ± 0.144 vs 2.101 ± 0.013 μ mol/g tissue, $p < 0.05$) but remained unchanged in plasma, liver, and renal

cortex. In addition, insulin stimulated incorporation of glucose into diaphragm glycogen was significantly increased in SHR-*Nrf2* transgenic rats when compared to controls (313 ± 48 vs. 151 ± 35 nmol gl./g/2h, $p < 0.05$).

Table 1 Parameters of oxidative stress associated with transgenic expression of *Nrf2*

Tissue	SHR	SHR- <i>Nrf2</i>
Glutathione peroxidase		
Plasma $\mu\text{mol NADPH min/ml}$	271 ± 19	$345 \pm 8^{**}$
Liver $\mu\text{mol NADPH min mg protein}$	206 ± 14	$288 \pm 18^{**}$
Myocardium $\mu\text{mol NADPH/min/mg protein}$	121 ± 14	$256 \pm 24^{***}$
Renal cortex $\mu\text{mol NADPH min/mg protein}$	146 ± 10	157 ± 16
Glutathione transferase		
Plasma, nmol CDNB, min/ml	4.50 ± 0.67	6.0 ± 0.66
Liver, nmol CDNB, min/mg protein	116 ± 11	$162 \pm 15^*$
Myocardium, nmol CDNB, min/mg protein	22 ± 3	$36 \pm 3^{**}$
Renal cortex, nmol CDNB, min/mg protein	48 ± 4	$70 \pm 7^*$
Glutathione reductase		
Plasma, $\mu\text{mol NADPH/min/ml}$	80 ± 8	87 ± 6
Liver, $\mu\text{mol NADPH/min/mg protein}$	101 ± 6	$142 \pm 15^*$
Myocardium, $\mu\text{mol NADPH/min/mg protein}$	49 ± 5	56 ± 6
Renal cortex, $\mu\text{mol NADPH/min/mg protein}$	25 ± 2	$33 \pm 3^*$
Reduced glutathione		
Plasma, $\mu\text{mol/ml}$	5.53 ± 0.19	$6.55 \pm 0.18^{**}$
Liver, mmol/mg protein	39 ± 4	41 ± 3
Myocardium, mmol/mg protein	24.9 ± 2.5	27.4 ± 1.7
Renal cortex, mmol/mg protein	11.7 ± 1.4	$15.9 \pm 0.9^*$
Catalase		
Plasma, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/ml}$	1170 ± 21	$1245 \pm 22^*$
Liver, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$	977 ± 25	$1251 \pm 25^{***}$
Myocardium, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$	712 ± 49	$881 \pm 56^*$
Renal cortex, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$	646 ± 50	$940 \pm 48^{***}$
TBARS		
Plasma, nmol/ml	1.701 ± 0.110	$1.070 \pm 0.101^{***}$
Liver, nmol/mg protein	1.637 ± 0.165	$0.957 \pm 0.097^*$
Myocardium, nmol/mg protein	0.591 ± 0.059	0.480 ± 0.029
Renal cortex, nmol/mg protein	0.691 ± 0.050	$0.552 \pm 0.037^*$

***, **, and * denote $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$

Numerous studies have shown that the *Nrf2*/ARE pathway regulates several clusters of genes important in antioxidation and detoxification in different pathologic conditions like cancer, obesity, diabetes, inflammation, atherosclerosis, autoimmune diseases etc. [for review see 5]. Current study was performed using a unique model of transgenic SHR-*Nrf2* rats. In contrast to many previous studies demonstrating increased expression of antioxidant enzymes, including SOD, GSH-Px, GST, GR and catalase, we showed elevated activity of these enzymes and their tissue specific activation. For instance, the activity of SOD was increased only in the renal cortex. Likewise, Zhu et al have shown that SOD expression was not increased in *Nrf2*^{+/+} cells in comparison to *Nrf2*^{-/-} cells under basal conditions suggesting that *Nrf2* signaling was not involved in the regulation of basal SOD expression [6].

The *Nrf2* overexpression was associated with amelioration of several parameters of lipid and glucose metabolism. We have shown increased both basal and insulin stimulated lipogenesis and adrenalin stimulated lipolysis in epididymal adipose tissue which suggests higher metabolic activity of this tissue in SHR-*Nrf2* transgenic rats. The consequence of increased lipolysis is elevated NEFA plasma concentration. Previously, Shin et al investigated the effect of the potent *Nrf2* activator CDDO-Imidazolide on adipose tissue morphology and fatty acid synthesis in *Nrf2*^{-/-} mice fed a high fat diet [7]. CDDO-Imidazolide inhibited accumulation of lipid droplets but did not contribute to changes in expression of fatty acid synthesis enzymes (fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylases 1 and 2). The *Nrf2* may regulate lipid homeostasis genes directly or indirectly by altering levels of lipid-related transcription factors and coregulators. For instance, Tanaka et al have shown decreased PPAR γ expression and elevated expression of sterol regulatory binding proteins in liver (SREBP-1c and SREBP-2) of *Nrf2*^{-/-} mice [8]. One of the proteins involved in lipid metabolism was shown to be strongly enhanced in *Nrf2*^{-/-} mice was the ATP citrate synthase [7]. This enzyme cleaves citrate to form acetyl-CoA and oxaloacetic acid. The latter is a precursor for pyruvate which is at the crossroads of multiple biochemical pathways including lipogenesis in many tissues and is especially active in liver. In addition, the role of *Nrf2* as a regulator of lipid metabolism is not restricted to the liver but likely extends also to the adipose tissue. Clearly, the role of *Nrf2* in lipid homeostasis is complex and requires further clarification.

A potential role for *Nrf2* in the regulation of glucose and lipid metabolism has recently been recognized. Aleksunes et al showed that *Nrf2*^{-/-} diabetic mice had higher glucose levels as compared to wild type diabetic mice and treatment with *Nrf2* activator oltipraz lowered blood glucose only in wild-type animals [9]. Thus *Nrf2* is an essential component of glucose metabolism. Current study provided compelling evidence that *Nrf2* plays an important role in regulating sensitivity of adipose and muscle tissues to insulin action.

Our results indicate that *Nrf2* transgenic expression ameliorated oxidative stress in plasma, liver, myocardium and kidney and improved some features of the metabolic syndrome. Given the regulatory role of the *Nrf2* of antioxidant system, insulin sensitivity and lipid homeostasis, the pharmacological manipulation of *Nrf2*, for instance with sulforafan and CDDO-Imidazolide, might be beneficial in treating metabolic disorders related to insulin resistance.

Reference

1. Tan Y, Ichikawa T, Li J, et al. Diabetes 2011; 60: 625-633.
2. Negi G. Biochem and Biophys Res Com 2011; 408: 1-5.
3. Yu Z, Shao W, Chiang Y. et al. Diabetologia 2011; 54: 922-934.
4. Malínská H, Oliyarnyk O, Hubová M, et al. Mol Cell Biochem 2010; 335: 119-258.
5. Kim J, Cha YN, Surh YJ. Mutation Res 2010; 690: 12-23.
6. Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, et al. FEBS Letters 2005: 3029-3036.
7. Shin S, Wakabayashi J, Yates MS, et al. European J Pharm 2009; 620: 138-144.
8. Tanaka Y, Aleksunes LM, Yeager RL, et al. J Pharm and Exp Ther 2008; 325: 655-664.
9. Aleksunes LM, Reisman SA, Yeager RL, et al. J Pharmacol Exp Ther 2010; 333: 140-151.

This study was supported by grant MZO 00023001, IAA-500110805

NOVÝ KRYŠÍ MODEL JATERNÍ STEATÓZY A CHRONICKÉHO ZÁNĚTU**E. Páleníčková, Z. Papáčková, O. Oliyarnyk, H. Daňková, M. Cahová, L. Kazdová***Institut klinické a experimentální medicíny, Praha***Abstract**

Low-level chronic inflammation and liver steatosis belong to the conditions often associated with metabolic syndrome and type 2 diabetes. In the present study we employed three unique genetic models that enabled us to study the role of above mentioned risk factors in the development of disorders associated with metabolic syndrome alone or in combination. The experiments were carried out on transgene rats overexpressing either CRP (model of chronic inflammation) or liver transcription factor SREBP-1a that regulates transcription of enzymes involved in fatty acid synthesis *de novo* (model of liver steatosis). The double transgene strain (CRP x SREBP-1a) was derived by direct crossing of both parental transgene strains and overexpressed both CRP and SREBP-1a genes. We found that SREBP-1a overexpressing phenotype is associated with the dysregulation of both lipid and glucose metabolism markers and mild steatosis while CRP overexpressing phenotype exhibit significantly higher steatosis, only mild elevation of triglyceridemia and free fatty acid content in serum while insulinemia remained normal. The phenotype of double transgene animals (mild dyslipidemia, normal glycemia and insulinemia, high TAG content in liver) did not represent simple accumulation of features found in both original strains what indicates that the information obtained on models of isolated disorders are of somewhat limited validity for the study of the development of such a complex disease like metabolic syndrome.

Úvod

Inzulínová rezistence (IR) je porucha účinku inzulínu a definujeme ji jako stav, při němž normální hladiny inzulínu v plazmě vyvolávají nižší biologickou odpověď organismu. IR obvykle chápeme ve spojitosti s metabolismem glukózy, ačkoli rezistence se může týkat i dalších účinků inzulínu, například jeho vlivu na metabolismus tuků a bílkovin, tedy stavu, kdy organismus není schopen přiměřeně reagovat na inzulín [1]. Tkáňová rezistence ve vztahu k účinku inzulínu je asociovaná s hypertriglyceridemií, hyperinzulinemií, zhoršenou glukózovou tolerancí a obezitou. Tyto vzájemně spojené metabolické poruchy výrazně zvyšují riziko rozvoje diabetu 2. typu a kardiovaskulárních chorob. Příčiny rozvoje inzulínové rezistence jsou multifaktoriální a patří k nim genetická predispozice, obezita a nutriční faktory.

Nealkoholická jaterní steatóza (NAFLD - nonalcoholic fatty liver disease) je celosvětově rozšířené chronické onemocnění jater zasahující jak dospělé, tak děti. Prostá steatóza je stav, kdy obsah tuku v játrech převyšuje 5 % hmotnosti jater. NAFLD je již provázená mírným zvýšením jaterních testů, zejména aktivity alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST) [2,3]. Prevalence NAFLD při metabolickém syndromu a diabetu 2. typu je téměř 100 %. Ačkoli NAFLD sama o sobě je benigní onemocnění, může přecházet v závažnější stádia, jako jsou fibróza, cirhóza a jaterní selhání a kromě toho může významně urychlovat rozvoj chorob asociovaných s metabolickým syndromem. Významným faktorem rozvoje NAFLD jsou změny v expresi transkripčních faktorů SREBPs (sterol regulatory binding proteins). Zvýšená hladina inzulínu je asociovaná se zvýšenou expresí SREBP-1c, který řídí transkripci genů pro enzymy podílející se na syntéze mastných kyselin *de novo* [4]. SREBP-1a a SREBP-2 přednostně aktivují syntézu cholesterolu. SREBP-1a stimuluje transkripci genu kódujícího acetyl-CoA-karboxylázu [5].

Zánět je důležité patofyziologické spojení mezi obezitou a metabolicko-cévními komplikacemi [6]. Zvýšené hodnoty zánětlivých ukazatelů, zvláště C-reaktivního proteinu (CRP) v krevní plazmě, jsou spojeny se zvýšeným rizikem cévního onemocnění. Existuje řada studií ukazujících, že stav chronického zánětu v tukové tkáni představuje jeden z kauzálních faktorů podmiňujících rozvoj tkáňové inzulinové rezistence a s ní spojené metabolické poruchy. Významným znakem probíhajícího zánětu jsou zvýšené hladiny CRP v krvi [7]. Řada prospektivních studií našla silnou, na dalších rizikových faktorech nezávislou, spojitost mezi sérovou koncentrací CRP a nástupem diabetu [8]. Dosud ne zcela vyjasněná je však otázka, zda zvýšené hladiny CRP přispívají k patogenezi choroby, nebo zda jsou pouze průvodním znakem zánětlivého procesu [9].

Cílem předkládané práce bylo studium vlivů různých rizikových faktorů, a to jaterní steatózy a chronického zánětu, na rozvoj poruch lipidového a glukózového metabolismu. Využití unikátních transgenních kmenů, u nichž byla navozena zvýšená exprese SREBP-1a nebo CRP, nám umožnila studovat vliv jednotlivých faktorů odděleně. V této práci je dále poprvé popsán dvojitě transgenní kmen exprimující jak SREBP-1a, tak i CRP, který umožňuje studium vlivu kombinace dvou různých rizikových faktorů.

Metodika

Pokusy byly provedeny na dospělých samcích kmene SHR (spontaneously hypertensive rats), u nichž byla navozena buď zvýšená exprese lidského CRP (SHR-CRP), nebo lidského SREBP-1a (SHR-SREBP-1a) v játrech. Jako kontroly sloužili potkani výchozího kmene SHR. Zvýšená exprese SREBP-1a byla dosažena injikací plasmidu obsahujícího lidský cDNA SREBP-1a gen a promotor PEPCK genu do zygoty SHR [10]. Lidský CRP byl exprimován pod kontrolou apoE promotoru [9]. Dvojitě transgenní kmen (CRP x SREBP-1a) vznikl cíleným křížením obou výchozích kmenů. Expresе vnesených genů byla ověřena pomocí PCR. Sérové koncentrace TAG, NEMK, cholesterolu, glukózy a inzulinu byly stanoveny komerčně dostupnými kity.

Výsledky a diskuze

Vliv zvýšené exprese CRP a SREBP-1a na celkovou tělesnou hmotnost a na hmotnost jednotlivých orgánů je uveden v tab. 1. U skupiny SHR-CRP je patrný nárůst tělesné hmotnosti, naopak u skupiny SHR-SREBP-1a jsme zjistili významný pokles. Zvýšená exprese CRP neovlivnila míru adipozity (váha epididymálního tukového tělesa vztahovaná na 100 g t. hm.), zatímco zvýšená exprese SREBP-1a vedla k jejímu drastickému snížení. Podle očekávání zvýšená exprese SREBP-1a vedla k vysoce signifikantnímu nárůstu hmotnosti jater, zvýšená exprese CRP se projevila pouze hraničně významným nárůstem jejich hmotnosti. Dvojitě transgenní kmen nevykazoval prostou kumulaci znaků pozorovaných u výchozích transgenních zvířat. U tohoto kmene jsme prokázali pokles celkové tělesné hmotnosti a naopak jsme zaznamenali nárůst adipozity. Proti očekávání jsme nenašli změnu v hmotnosti jater.

Tabulka 1 Vliv zvýšené exprese CRP a SREBP-1a na tělesnou hmotnost a hmotnost vybraných orgánů

	SHR kontroly (n=7)	SHR-CRP (n=5)	SHR kontroly (n=9)	SHR-SREBP-1a (n=11)	SHR kontroly (n=10)	CRP×SREBP-1a (n=5)
celk. váha (g)	289 ± 4	309 ± 5*	376 ± 7	343 ± 7#	297 ± 5	250 ± 5†
ETT/100 g						
t.hm.	0,61 ± 0,04	0,64 ± 0,03	0,68 ± 0,05	0,18 ± 0,04#	0,70 ± 0,02	1,10 ± 0,10†
játra (g)	10,8 ± 0,2	12,8 ± 0,5*	15 ± 0,7	21,5 ± 0,5#	11,0 ± 0,24	12,1 ± 0,36
srdce (g)	1,09 ± 0,02	1,31 ± 0,04*	—	—	1,08 ± 0,03	0,95 ± 0,03†
ledviny (g)	2,09 ± 0,06	2,54 ± 0,16*	—	—	1,96 ± 0,05	1,67 ± 0,06†

Hodnoty udávají průměr ± stand. chyba průměru. *CRP vs kontrola $p < 0,05$; #SREBP-1a vs kontrola $p < 0,05$; †CRP-SREBP-1a vs kontrola $p < 0,05$.

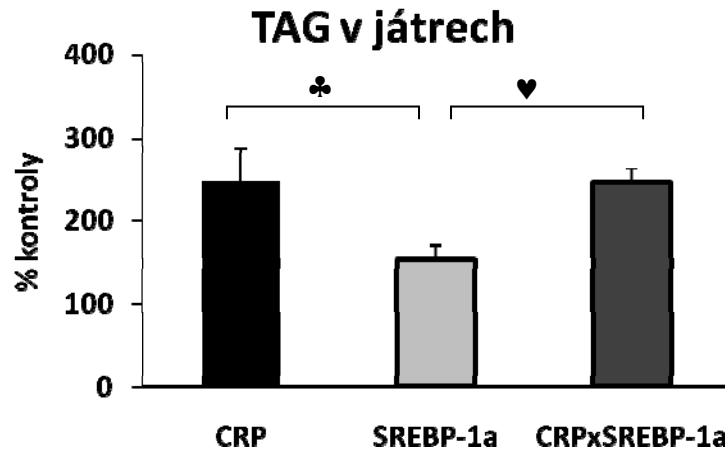
Základní trend změn parametrů lipidového metabolismu u jednotlivých experimentálních skupin byl shodný, i když intenzita poruch se mezi skupinami lišila. U všech skupin došlo ke srovnatelnému vzestupu koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) v séru. Triglyceridémie byla nejvíce zvýšená ve skupině SHR-SREBP-1a, nejméně u skupiny SHR-CRP. Proti očekávání byla triglyceridémie u dvojité transgenního kmene sice zvýšená ve srovnání s kontrolami, ale významně nižší ve srovnání s kmenem SHR-SREBP-1a. Poruchu glukózového metabolismu, a to vzestup syté glykémie a inzulinémie, jsme prokázali pouze u kmene SHR-SREBP-1a.

Tabulka 2 Vliv zvýšené exprese CRP a SREBP-1a na základní parametry lipidového a glukózového metabolismu.

	SHR kontroly (n=7)	SHR-CRP (n=5)	SHR kontroly (n=9)	SHR-SREBP1a (n=11)	SHR kontroly (n=10)	CRP×SREBP-1a (n=5)
TAG (mmol/l)	0,64 ± 0,03	0,84 ± 0,05*	0,47 ± 0,03	5,60 ± 0,94#	0,52 ± 0,03	1,39 ± 0,08†
NEMK (mmol/l)	0,33 ± 0,03	0,76 ± 0,07*	0,51 ± 0,02	0,83 ± 0,04#	0,37 ± 0,04	0,86 ± 0,05†
Glc (mmol/l)	3,63 ± 0,09	4,08 ± 0,16*	5,20 ± 0,20	6,10 ± 0,30#	6,80 ± 0,13	6,30 ± 0,12†
Inzulin (nmol/l)	0,26 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,88 ± 0,09#	0,40 ± 0,04	0,35 ± 0,10
Chol (mmol/l)		1,29 ± 0,06*	1,80 ± 0,10	2,20 ± 0,20#	1,11 ± 0,04	1,16 ± 0,07

Hodnoty udávají průměr ± stand. chyba průměru. *CRP vs kontrola $p < 0,05$; #SREBP-1a vs kontrola $p < 0,05$; †CRP×SREBP-1a vs kontrola $p < 0,05$.

U všech transgenních skupin jsme prokázali signifikantně vyšší obsah TAG v játrech ve srovnání s kontrolním kmenem SHR. Ve skupině SHR-CRP jsme prokázali vyšší obsah TAG v játrech v porovnání se zvířaty se zvýšenou expresí SREBP-1a, tedy přesně opačný vztah, než v případě obsahu TAG v séru. Předpokládáme, že toto pozorování by bylo možné vysvětlit rozdílnou schopností sekrece VLDL z jater u obou kmenů. Dvojité transgenní skupina také potvrdila tento protikladný trend mezi TAG v séru a TAG v játrech. Svými hodnotami TAG v séru a v játrech se kmen CRP-SREBP-1a podobá skupině SHR-CRP.



Obr. 1 Vliv zvýšené exprese CRP a SREBP-1a na obsah TAG v játrech. Hodnoty udávají průměr ($n = 5$ až 9) \pm stand. chyba průměru. ♣ SREBP-1a vs CRP $p < 0,0001$; ♥ CRP-SREBP-1a vs SREBP-1a $p < 0,01$.

Závěry

Zjistili jsme, že geneticky navozená steatóza prostřednictvím zvýšené exprese SHR-SREBP-1a je spojena s poruchami lipidového a glukózového metabolismu. Naproti tomu overexprese SHR-CRP je asociována pouze s poruchami metabolismu lipidů, přičemž inzulinémie je normální. Dvojitě transgenní kmen (CRP x SREBP-1a) vykazoval spíše znaky rodičovského CRP fenotypu (dyslipidemie, normální glukózová tolerance, zvýšený obsah TAG v játrech).

Reference

1. Pelikánová T. Interní Med pro praktické lékaře 2004; 1: 43-8.
2. Li Z., et al. Hepatology 2008; 47: 1495-503.
3. Wei Y., et al. World J Gastroenterol 2008; 14: 193-9.
4. Horton JD., et al. J Clin Invest 2002, 109:1125-31
5. Brown MS., et al. Cell 1997; 89: 331-40.
6. Faber DR., et al. Atherosclerosis 2010; 212: 274-80.
7. Alkhoury N. et al. J Biol Chem 2010; 285: 3428-38.
8. Devaraj S., et al. Curr Opin Lipidol 2009; 20: 182-9.
9. Pravenec M., et al. Hypertension 2011; 57: 731-7.
10. Qi NR., et al. Hypertension 2005; 45: 1004-11.

Studie byla podpořena z grantu IGA MZ ČR NS 10504-3

HOMOCYSTEIN, VITAMINY B A PORODNÍ HMOTNOST V ČESKÉ POPULACI**HOMOCYSTEINE, VITAMINS B AND BIRTH WEIGHT IN CZECH POPULATION****D. Palyzová¹, J. Riedlová², V. Kožich³***1 Klinika dětí a dorostu 3. LF UK Praha**2 Ústav anatomie 3. LF UK Praha**3 Ústav dědičných metabolických poruch 1. LF UK Praha***Abstract**

Fetal hypotrophy is closely associated with quantitative and/or qualitative fetal undernourishment, which is considered to cause chronic diseases including cardiovascular disorders. The present study investigated interactions of the metabolism of homocysteine (Hcy) and its cofactors (vitamin B12, B6, folate) with birth weight in physiologic and hypotrophic newborns. The mothers in the affected group were more often smokers, had significantly lower weight, lower weight gain during pregnancy and lower placenta weight. Gestational age, parity, number of pregnancies, vitamin supplementation during the pregnancy, MTHFR genotype, and plasma levels of Hcy, folate and vitamin B6 did not affect the newborn's weight. The etiology of the significantly higher levels of cobalamine in both mothers and their hypotrophic offspring than in the control set remains unknown. Multivariate logistic regression analysis ascertained a significant effect of the placenta weight, creatinine levels and mother's smoking during the pregnancy in prediction of fetal birth hypotrophy. Homocysteinemia at the time of delivery was not associated with birth weight of the newborns. Intrauterinní růstová retardace (IURG) je považována za rizikový faktor pro vznik chronických chorob dospělého věku, včetně onemocnění kardiovaskulárního systému. Jednou z příčin IURG je fetální podvýživa z primárního nedostatku makro- a mikronutrientů, nebo metabolické poruchy jejich využití rostoucími tkáněmi fétu.

Cílem práce bylo testovat možnost příčinného vztahu mezi parametry metabolismu homocysteinu (Hcy) a vybraných kofaktorů (vitamin B12, holotranskobalamin-holoTC, vitamin B6, folát) u fyziologických a hypotrofických novorozenců (SGA-small for age) v korelaci s mateřskými hladinami a v závislosti na porodní hmotnosti.

Soubor cílový je tvořen 98 páry matka–SGA novorozenec (soubor B), s porodní hmotností nižší než hodnota 10. percentilu pro daný gestační týden a pohlaví novorozence (5), soubor kontrolní sestává z 92 párů matka-fyziologický novorozenec (soubor A). Požadovaná kritéria pro zařazení do studie zahrnovala donošenost plodu (gestační věk 38.- 42.týden), u matek anamnestické vyloučení hypertenze, diabetu mellitu, metabolického syndromu a dalších onemocnění ovlivňujících metabolismus Hcy, vitamínu B12, B6 a folátu a dlouhodobé farmakoterapie. Bezprostředně po porodu novorozenci nevyžadovali intenzivní péči, nebyly shledány závažné vrozené vývojové vady.

Srovnávána byla anamnestická data matky (základní sociální a antropometrická data, průběh těhotenství a porodu) a antropometrická data novorozence. Biochemická a genetická analýza vzorků venózní krve matky získané bezprostředně po porodu a pupečnickové krve novorozence zahrnovala parametry metabolismu Hcy (Hcy, vitamin B12, holoTC, vitamin B6, folát) a dvě varianty v genu pro methyilentetrahydrofolát reduktázu (MTHFR, c.677T a c.1298C).

Matky hypotrofických novorozenců byly častěji kuřačky již před otěhotněním i v průběhu těhotenství ($p = 0,009$), jejich hodnoty tělesné výšky, hmotnosti, BMI před těhotenstvím i před porodem ($p = 0,004$) a těhotenského přírůstku hmotnosti ($p = 0,0001$) byly ve srovnání

s matkami novorozenců fyziologických významně nižší. Věk matky, vzdělání rodičů, parita, četnost těhotenství, těhotenská suplementace vitaminy a gestační věk neovlivňovaly hmotnost novorozence.

Hodnoty všech antropometrických parametrů novorozence, tj. tělesná hmotnost, délka, obvodové, šířkové rozměry, vybrané kožní řasy ($p = 0.0001$) a hmotnost placenty ($p = 0,0001$) byly významně nižší u probandů souboru cílového než kontrolního.

Homocysteinemie matek obou souborů byla vyšší než u novorozenců.

Univariální analýza nepotvrdila statisticky významné rozdíly plazmatických hodnot folátu, vitamínu B6 a Hcy mezi soubory matek ani novorozenců. Významně vyšší jsou plazmatické hodnoty kobalaminu u novorozenců než matek obou skupin, a dále u matek ($p = 0,004$) i dětí ($p = 0.0002$) souboru cílového než kontrolního.

Korelační studie novorozeneckých dat prokázala v obou souborech významnou negativní korelaci mezi hladinami Hcy a holoTC ($p = 0,01$), folátem ($p = 0,05$) a vitamínem B6 ($p = 0,01$).

Asociační studie (case-control) nenalezla statisticky významné rozdíly frekvence alel nesoucích variantu 677T a 1298C, rovněž se nelišilo rozložení jednotlivých genotypů mezi matkami a novorozenci v obou souborech.

Multivariální logistická regresní analýza testovala vliv vybraných proměnných matky (hmotnost, Hcy, vitamin B12, kreatininemie, kouření před těhotenstvím a v těhotenství, varianty MTHFR) a dítěte (gestační věk, hmotnost placenty, MTHFR): signifikantní vliv na predikci hypotrofie plodu mají kretininemie matky, hmotnost placenty a kouření matky v těhotenství.

Výsledky studie neprokázaly vliv homocysteinemie na porodní hmotnost.

Etiologie vyšších hladin kobalaminu u hypotrofických novorozenců a jejich matek než v souboru kontrolním zůstává zatím neznámá.

V posledních letech je diskutována hypotéza fetálního programování chronických onemocnění (1) jako důsledek disharmonického vývoje plodu souvisejícího s poruchou jeho výživy, funkce fetomaternální jednotky (6) a následné IURG. Během kritické fáze vývoje plodu se může prenatalní a časné postnatalní porucha výživy podílet na „programování“ rozvoje obezity, časné fáze aterosklerózy, diabetu mellitus i hypertenze. Ohroženou skupinou jsou především jedinci s nízkou porodní hmotností a délkou a malým objemem placenty (primární porucha vývoje placenty).

Klíčové vitamíny B (vitamin B12, B6, kyselina listová), jejichž spotřeba v těhotenství vysoce stoupá, ovlivňují růst plodu, významnou roli hrají i jako kofaktory metabolismu Hcy. V průběhu těhotenství je metabolismus Hcy modifikován: během 1. a 2. trimestru hladina Hcy klesá především v důsledku fyziologických hormonálních změn (12). Obvyklé plazmatické hodnoty u zdravých žen na konci těhotenství se pohybují mezi 5-8 $\mu\text{mol/l}$ (12). Hcy je sekvestrován z mateřského oběhu a následně využit pro stavbu fetálních tkání (7). Fetální koncentrace Hcy setrvává na nízké hladině pravděpodobně díky vysoké metabolické potřebě tetrahydrofolátu při syntéze DNA (9).

Novorozenecké hodnoty Hcy jsou nižší než mateřské, rozdíly činí 0.5 - 2 $\mu\text{mol/l}$, průměrně 4 - 7 $\mu\text{mol/l}$ (11,13). Homocysteinemie v dokumentovaných souborech naší studie matek a jejich fyziologických i hypotrofických novorozenců byla ve shodě s výše zmíněnými pracemi. Podobně jako v jiných studiích (2) nebyl ani v naší práci potvrzen významný vztah mezi mateřskou hladinou Hcy a porodní hmotností.

Plazmatické hladiny vitamínu B12 rovněž zaznamenávají v průběhu těhotenství pokles (4), avšak hladiny kobalaminu i holoTC v pupečnickové krvi dosahují násobků mateřských hodnot (8,10). Stejný trend byl potvrzen i ve vlastní studii, s nápadně velkým rozptylem interindividuálních hodnot, který byl popsán dříve literárně (3). Vyšší hladinu fetálního kobalaminu (ve srovnání s hladinou mateřskou) lze vysvětlit mimo jiné placentární syntézou

transkobalaminu a hustotou transkobalaminových receptorů v placentě samotné, účinnou extrakcí z mateřské cirkulace, redistribucí mikronutrientů ve fetální tkáni a nízkým podílem vitamínu B12 ve fetálních játrech (30%). Plod retinuje většinu vitamínu B12 v krvi a využívá potřebné množství pro biochemické reakce. Transport mateřského kobalaminu je pravděpodobně determinován jinými faktory než jeho koncentrací (9).

Mateřské koncentrace vitamínů B i Hcy predikují hladiny ve fetální krvi v době narození.

Pro nález vyšších hladin kobalaminu u matek i dětí našeho cílového souboru zatím nebylo nalezeno jednoznačné vysvětlení. Výsledky nabízejí hypotézu poruchy v remetylačním cyklu Hcy, ev. receptorovou poruchu nebo jinou metabolickou abnormitu, omezující využití kobalaminu plodem.

Reference

1. Barker DJ. The fetal origin of hypertension. *J Hypertens Suppl* 1996; 14(5): S117-S120.
2. Infante-Rivard C., et al. Unexpected relationship between plasma homocysteine and intrauterine growth restriction. *Clin Chem* 2003; 49: 1476-1482.
3. Karademir F., et al. Vitamin B12, folate, homocysteine and urinary methylmalonic acid levels in infants. *J Internat Med Res* 2007; 35: 384-388.
4. Koebnick H., et al. Longitudinal concentration of vitamin B12 and vitamin B12-binding proteins during uncomplicated pregnancy. *Clin Chem* 2002; 48: 928-933.
5. Kučera J., et al. Nové tabulky normální porodní hmotnosti pro Českou republiku. *Čs Pediatr* 1999; 54: 572-578.
6. Langley-Evans SC. Developmental programming of health and disease. *Proc Nutr Soc* 2006; 65: 97-105.
7. Malinow MR., et al. The relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma homocysteine suggests a potential role for maternal homocysteine in fetal metabolism. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 228-233.
8. Murphy MM., et al. Longitudinal study of the effect of pregnancy and maternal and fetal cobalamin in healthy women and their offspring. *Am Soc Nutr J Nutr* 2007; 137: 1863-1867.
9. Obeid R., et al. Biochemical indexes of the B vitamins in cord serum are predicted by maternal B vitamin status. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 133-139.
10. Obeid R., et al. The cobalamin-binding proteins transcobalamin and haptocorrin in maternal and cord blood sera at birth. *Clin Chem* 2006; 52: 263-269.
11. Raijmakers MTM., et al. Umbilical cord and maternal plasma thiol concentrations in normal pregnancy. *Clinical Chemistry* 2001; 47: 749-751.
12. Walker MC., et al. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 660-664.
13. Wallace JMW., et al. Homocysteine concentration, related B vitamins, and betaine in pregnant women recruited to the Seychelles Child Development study. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 391-397.

Studie podporována VZ1 3. LF UK, MSM001620814

ARTIFICIAL PHOSPHOLIPID MEMBRANES AS MODELS OF REAL MEMBRANES AND TRANSPORT OF CHARGED PARTICLES ACROSS THEM

M. Parisová¹, T. Navrátil¹, I. Šestáková¹, E. Kohlíková², M. Petr²

¹*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of ASCR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic*

²*Department of Physiology and Biochemistry, Faculty of Physical Education and Sport, Charles University in Prague, José Martího, 162 52 Prague 6, Czech Republic*

Abstract

Because the real bio-membranes and the transporting processes realized across them are very complicated, the model membranes have been used for elucidation of the basic transporting steps. In the contribution, the different possibilities of characterization, description, and elucidation of the transport processes on the example of some metal ions and their complexes, i.e., of cadmium, lead, and copper, were presented. It summarizes the results achieved using supported phospholipid model membranes formed on porous membranes and on agar support. Discussed transporting processes of selected ions have been characterized using two electrochemical methods: electrochemical impedance spectrometry (EIS) and voltammetry. The impact of some parameters on these systems and processes was investigated.

Introduction

All living cells of plants and of animals (and of some viruses too) are surrounded by lipid bilayer membranes (LBM). These membranes are flat sheets that form a continuous barrier around cells and subcellular structures. The phospholipids are the basic building elements of most natural membranes. Additionally to phospholipids, the membranes contain a wide variety of biological molecules, primarily proteins and lipids, which take part in many cellular processes, such as ion channeling, conductance, cell signaling, etc. [1, 2]). Lipid bilayers (LBs) (or phospholipid bilayers (PLBs)) are thin, flat membranes consisting of two layers of lipid molecules, with their hydrophobic parts, usually fatty acid tails, directed toward the center of the membrane, and with hydrophilic parts located at the inner and outer borders [3].

Because the real cell membranes are very complicated, we were using model membranes, more precisely, model supported phospholipid (SPL) membranes (SPLM) or bilayers (SPLB), which should represent, in the first approximation, the real protoplast membrane [1, 3, 4]. There are many different principles, on which the molecules, ions, or particles are transported across the bilayer membrane. The preparation of model PL membranes in different ways and transport of particles (heavy metal ions Cd^{2+} , Pb^{2+} , etc. and their complexes) across them have been studied by our research team for a few last years (e.g., [1, 3-12]).

Various techniques have been applied to the study of the membrane formation and of the transporting processes investigation. However, the electrochemical methods (voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy (EIS)) proved to be very successful in this research.

¹ Correspondence author

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) (e.g. [13]) can be very suitable for characterization of the formed PLBs (black lipid membranes (BLM)) [14]. Such relatively simple (however highly sophisticated) non-invasive method provides the detailed structural-functional information on these systems ([15] and the references therein). The simplest way is to form such a bilayer on some supporting material (supported phospholipid bilayers; SPBL), e.g., a metallic substrate (mercury [14], gold, or on some gel surface), or in the form of a self-supporting membrane, e.g., as a bubble at a Teflon cap [16-19], filling a small micro-holes in a plate [20], or in a membrane [5, 10].

Our research team devoted its attention to preparation of PLBs on the surfaces of porous membranes [12] and a new promising approach for the preparation of PLB membranes seems to be the application of sol-gel technology, i.e., formation of PLBs at the agar electrode (e.g., [9]).

Methods

Used Apparatus

For quantification of the electrochemical impedances, silver/silver chloride electrodes (silver wire, diameter 1 mm, electroplated with silver chloride) were used. Platinum wire, diameter 1 mm, served as the auxiliary electrode. These measurements were realized using a CHI 650C Electrochemical Analyzer/Workstation, Software: CHI v. 8.1 (IJ Cambria Scientific, Carms, UK).

The voltammetric determinations of lead, cadmium and copper ions and their complexes were carried out using a PC-controlled voltammetric analyzer ECO-TRIBO polarograph (Polaro-Sensors, Prague, Czech Republic), equipped with MultiElchem v. 2.1 software [21] (J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of AS CR, v.v.i., Prague, Czech Republic) and with POLAR.PRO software v. 5.1 (Polaro-Sensors, Prague, Czech Republic). A pen-type electrode HMDE was used as the working electrode, an Ag/AgCl/KCl (3 mol.L⁻¹) as the reference electrode to which all the potentials are referred to, and a platinum wire served as the counter electrode (both Elektrochemické Detektory, Turnov, Czech Republic). The applied parameters were: Accumulation potential (E_{acc}) = -850 mV, accumulation time (t_{acc}) = 180-360 s, initial potential (E_{in}) = -700 mV, final potential (E_{fin}) = +150 mV, scan rate 10 mV.s⁻¹.

The pH was measured by a digital pH/mV meter MPH 61 with a combined electrode TYPE 01-29 (all from Monokrystaly, Turnov, Czech Republic).

Cell Designs for EIS Measurements

Two different types of cells were constructed by our research group for investigation of the PLB on porous membranes: A) "U_Cell". The part of polycarbonate membrane is placed between two parts of glass U-shaped cell, which were then filled with a proper electrolyte or sample [7, 8]; B) "Insert" cell - made from polythene tube cup with a hole, on which polycarbonate membrane was sealed with different epoxy resins onto the plastic cup with a small hole in the center, prior to the application of the phospholipid solution. This cup subsequently formed the bottom of the upper part of the polypropylene electrochemical cell. The schematic and photographic pictures of cells were published in [1, 3, 10]. The working electrode (silver wire electroplated with silver chloride) was immersed in the upper part and the reference electrode (silver wire electroplated with silver chloride) and the auxiliary platinum electrode were immersed in the bottom part.

Preparation of Supported Phospholipid Bilayers

The way used to preparation of PLBs on porous membranes was described in detail, e.g., in [1, 3, 10]. We mention the basic points here: A phospholipid solution (20 mg.mL⁻¹ in n-heptane) was applied to both sides of the porous polycarbonate membrane and the solvent was evaporated on the air. The ionophores were added to the phospholipid solutions before their application on the membrane surfaces.

The preparation of PL on the surface of agar-substrates has been tested in the framework of our research too. The gel can be prepared by mixing a suitable polymer (PVC, agar, agarose, etc.) with one of the electrolyte solutions at an elevated temperature. After cooling the mixture to room temperature in a suitable mould, the gel electrode is formed. It assumes a variety of shapes and it is easy to handle [9].

Results and Discussion

In correspondence with the earlier published results (e.g., [1, 3, 5, 10]), it can be concluded that the model membranes in the form of SPLBs can be used for simulation of real cell membranes. Various reliable and reproducible ways of their preparation were worked out and tested, as well as methods of their characterization using electrical equivalent circuits. The SPLB can be considered as completely formed in about 40-60 minutes after application of phospholipids on the support holder, the times of formation are a bit shorter in case of membranes formed on agar support. The values of its capacitance(s) increase after the SPLB exposure to the aqueous phase till steady state is reached. Relatively high stability of SPLB allows the studies of the influence of inserted DC voltage. Applied voltages in interval from +0.4 V to -0.4 damage the consistency of the SPLBs reversibly. Insertion of higher voltage can destroy them irreversibly.

The results achieved using DPPC are almost equivalent to those achieved using DPPE.

The results from both tested cell types ("U-cell" and "Insert") are very similar and from the statistical point of view they do not differ [3].

We can conclude that the procedure of incorporation of ionophore valinomycin and calcimycin was successfully realized. Valinomycin proved to be suitable for transport of K⁺ (univalent) cation and not for transport of Ca²⁺ (divalent) cation across SPLBs. On the other hand, the addition of calcimycin to the SPLBs enables transport of divalent cations, e.g., Cd²⁺. It was revealed that the presence of Ca²⁺ cations enhances the transport of Cd²⁺ cations across the DPPC SPLB with incorporated calcimycin [1, 4].

Surprisingly, the presence of a LMWOA (e.g., oxalic acid) enables the transport of cations of heavy metals (Pb²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺) across the DPPC SPLB in absence of any ionophore [11, 12].

One of the aims of our investigations is the preparation of SPBLs on an agar gel electrode. Such type of SPBLs can be applied to biosensors, micro- and nano-structures, blood-compatible surfaces, medical implant devices, and to production of catalytic interfaces [1, [22]. Many further applications have been proposed or are currently under study [1]. Systematic studies of the mechanisms of SPB formation, such as the conditions for fusion of adsorbed vesicles, have only been performed over the last few years. In the suggested agar-gel SPBL's, the agar gel is supposed to serve as a new type of "soft polymer cushion" [1, 22].

The suitable measuring and analytical techniques for these purposes have been developed. Because the amounts of ions transported across the membranes are very small, they can be measured using patch clamp technique directly or after accumulation of the transported species using anodic stripping voltammetry. This method enables to differentiate between signals belonging to metallic ions and those produced by their complexes.

Conclusion

Formation of phospholipid bilayer within the pores of polycarbonate membrane or on the surface of an agar electrode offers possibility to combine ESI measurement in order to follow PLB formation and properties and enable variable exposition of formed PLB membrane to the presence of metal ions or their complexes, changes of pH etc. The influence of PLB composition and presence of ionophores can be also easily varied.

References

1. Navratil T., Sestakova I., Jaklova Dyrtrtova J., Jakl M., Marecek V. WSEAS Trans Environ Dev 2010; 6: 208.
2. Navratil T., Sestakova I., in 5th WSEAS International Conference on Environment, Ecosystems and Development 2007 Eds: M. Ottesteanu, S. Celikyay, N. Mastorakis, S. Lache, and F. K. Benra), World Scientific and Engineering Acad and Soc, Puerto de la Cruz, SPAIN, pp. 174.
3. Navratil T., Sestakova I., Stulik K., Marecek V. Electroanalysis 2010; 22: 2043.
4. Navratil T., Sestakova I., Jaklova Dyrtrtova J., Jakl M., Marecek V. in 7th WSEAS International Conference on Environment, Ecosystems and Development 2009 Eds: M. Ottesteanu, S. Celikyay, N. Mastorakis, S. Lache, and F. K. Benra), World Scientific and Engineering Acad. and Soc., Puerto de la Cruz, SPAIN, pp. 212.
5. Navratil T., Sestakova I., Marecek V. in Modern Electrochemical Methods XXIX 2009 Eds: J. Berek and T. Navratil), BEST Servis, Jetrichovice, pp. 74.
6. Navratil T., Sestakova I., Marecek V. in Development, Energy, Environment, Economics (DEEE '10) 2010 Eds: V. Mladenov, K. Psarris, N. Mastorakis, A. Caballero, and G. Vachtsevanos), Puerto de la Cruz, pp. 192.
7. Navratil T., Sestakova I., Marecek V. Int J Energy Env 2011; 5: 337.
8. Navratil T., Sestakova I., Marecek V. in Modern Electrochemical Methods XXXI 2011 Eds: T. Navratil and J. Berek), BEST Servis, Jetrichovice, pp. 91.
9. Navratil T., Sestakova I., Marecek V. Int J Electrochem Sci 2011; Submitted.
10. Navratil T., Sestakova I., Marecek V., Stulik K. in Modern Electrochemical Methods XXX 2010 Eds: J. Berek and T. Navratil), BEST Servis, Jetrichovice, pp. 119.
11. Sestakova I., Jaklova Dyrtrtova J., Jakl M., Navratil T. in Development, Energy, Environment, Economics (DEEE '10) 2010 Eds: V. Mladenov, K. Psarris, N. Mastorakis, A. Caballero, and G. Vachtsevanos), Puerto de la Cruz, pp. 186.
12. Sestakova I., Jaklova Dyrtrtova J., Jakl M., Navratil T. Int J Energy Env 2011; 5: 347.
13. Bordi F., Cametti C., Gliozzi A. Bioelectrochemistry 2002; 57: 39-46.
14. Becucci L., Moncelli MR., Guidelli R. Langmuir 2003; 19: 3386.
15. Coster HGL., Chilcott TC., Coster ACF. Bioelectrochem Bioenerg 1996; 40: 79.
16. Naumowicz M., Figaszewski ZA. Bioelectrochemistry 2003; 61: 21-27.
17. Naumowicz M., Figaszewski ZA. Biophys J 2005; 89: 3174-3182.
18. Naumowicz M., Figaszewski ZA. J Membr Biol 2005; 205: 29-36.
19. Naumowicz M., Kotynska J., Petelska A., Figaszewski ZA. Eur Biophys J 2006; 35: 239-249.
20. Lhotsky A., Holub K., Neuzil P., Marecek V. J Chem Soc Faraday Trans. 1996; 92: 3851.
21. Yosypchuk B., Navratil T., Lukina AN., et al. Chem Anal (Warsaw) 2007; 52: 897.
22. Sackmann E. Science 1996; 271: 43-48.

Acknowledgment

This research has been supported by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the CR (project No. IAA400400806) and by the Czech science foundation (GAČR project No. P206/11/1638)

MONITORING RIZIKOVÝCH FAKTOROV ATEROSKLERÓZY U DETÍ S FAMILIÁRNOU ZÁŤAŽOU

MONITORING OF RISK FACTORS ATHEROSCLEROSIS IN CHILDREN WITH FAMILY - HISTORY

D. Petrášová, I. Bertková, J. Koprovičová

Ústav experimentálnej medicíny LF UPJŠ Košice, Slovenská republika

Abstract

The authors subjected to comprehensive examinations 94 children (48 boys and 46 girls) with a mean age of 11,5 years whose parents had suffered from serious cardiovascular disease before the age 50 years. In addition to the lipid status they examined also other parameters to detect as many risk factors as possible. In 70,2 % of the examined children they revealed dyslipidaemia, 33 % were obese, 10,7% suffered from hypertension, 14,3 % from subclinical hypothyroidism and 52,9 % belonged into the group of behaviour A. Values of the carbohydrate and mineral metabolism were within the normal range, cardiological, nephrological and ophtalmological examination did not reveal any pathological changes. After summarizing the results the authors found that in addition to a positive family – history in 89,3 % of the examined subjects another 1-6 risk factors were present. The authors recommend screening of the lipid metabolism (TCH, HDL, TG, LDL) in all the children with a positive cardiovascular family – history using the widest possible range of examination to reveal the maximum possible number of abnormalities which can participate in the early manifestation of the atherosclerotic process. They found an alarming lack of knowledge as regards cardiovascular disease not only in children but also in their parents. They recommend to include educational programmes on cardiovascular problems already into the syllabi for elementary schools. The basic examination should be made when the child starts school, and examinations should be continuously supplemented during preventive examination.

Úvod

So zmenou životného štýlu a zloženia stravy rapídne stúpa vo svete prevalencia kardiovaskulárnych ochorení. Koronárna ateroskleróza a infarkt myokardu sú hlavnou príčinou morbidity a mortality nielen vo vyspelých krajinách, ale i u nás. Dominantné postavenie zaujíma ateroskleróza a z jej potencovania vyplývajúce kardiovaskulárne i cerebrálne komplikácie. Epidemický výskyt nestačí kompenzovať ad hoc vykonávaná prevencia, liečba zväčša urgentného charakteru aj napriek dynamickému rozvoju kardiológie, kardiochirurgie, angiológie či farmakológie. Začiatok kardiovaskulárnych ochorení treba hľadať už v detskom veku, lebo patologicko – anatomické nálezy svedčia preto, že včasné aterosklerotické zmeny sa začínajú už v detskom veku. Pomaly progredujú do dospelosti a preto ak im chceme predísť či spomaliť ich rozvoj s preventívnymi opatreniami musíme začať už detskom veku. Tieto ochorenia postihujú iba niektorých jedincov, alebo sa koncentrujú iba v niektorých rodinách. Tieto poznatky upozorňujú na významný vplyv dedičnosti v genéze týchto ochorení pričom mnohí autori považujú hereditárne faktory za vôbec najdôležitejšie.

Materiál a metóda

Vyšetrili sme 94 detí zo 71 rodín, ktoré sa javili ako najviac ohrozené a ich rodičia prekonalí pred 50. rokom svojho veku závažné kardiovaskulárne ochorenia. Do kontrolného súboru sme vybrali 80 detí s negatívnou kardiovaskulárnou záťažou. Pri vstupnom vyšetrení

bola vyhodnotená osobná a rodinná anamnéza a podrobné klinické vyšetrenie. Súbor biochemických vyšetrení sme robili zo vzorky venóznej krvi, odobratej po 12 – hodinovom lačnení u sediaceho probanda z kubitálnej žily. Z nej sme stanovovali hodnoty glykémie, nátria, kália, kreatinínu, celkového cholesterolu (TCH), HDL, triacylglycerolov (TG) , apolipoproteínu B (ApoB) , Lp(a) a aterogénnych indexov. Okrem parametrov lipidového metabolizmu sme stanovili neenzýmové vysokomolekulové antioxidačné látky a to ceruloplazmín a transferín. Z nízkomolekulových antioxidantov sme stanovili kyselinu askorbovú a vitamín E.

Kardiologické vyšetrenie pozostávalo z klinického vyšetrenia a pokojového EKG. U detí starších ako 10 rokov ku komplexnému vyšetreniu bolo tiež určenie typu osobnosti – Hunter-Wolfov A/B „rating scale“ v modifikácii podľa Skorodenského.

Výsledky

Výsledky sme štatisticky vyhodnotili použitím testov ANOVA a Studentovho t – testu. Najnižšia tolerovateľná hladina štatistickej významnosti bola $p < 0,05$. Z údajov rodinnej anamnézy sme zistili u mužského pohlavia absolútnu prevahu výskytu infarktu myokardu (IM) (92 %). Závažné sú tiež údaje o veku, v ktorom sa ochorenie manifestovalo alebo došlo k úmrtiu. Išlo o 31 – ročných jedincov. Sondovanie po abúze nikotínu a alkoholu vyznelo u všetkých negatívne. Fyzická aktivita bola nedostatočná. Zistili sme závažné nedostatky v nutričných návykoch. Stav výživy sme posudzovali podľa hodnôt BMI. Hodnoty pre obezitu sme zistili u 31 detí (33 %) s priemernou hodnotou 28,0 plus mínus 2 kg/m². Chudé 28 detí (29,8 %) boli výrazne astenického habitu.

Zvýšené hodnoty systolického alebo diastolického tlaku vzhľadom k veku sme našli u 14 detí, čo činí 14,9 %. To považujeme vzhľadom na detský vek za znepokojujúci výskyt. Hodnoty glycidového a minerálneho metabolizmu, sérových transamináz a kreatinínu boli u všetkých vo fyziologickom rozmedzí. Hodnoty boli vo všetkých prípadoch normálne (od 65 – 165 nmol/ L). U 13 detí sme zaznamenali zvýšené hodnoty TSH (normálne hodnoty do 5 uU/mL). U 4 detí sa združovali so zvýšenými hodnotami TCH a LDL cholesterolu. Kardiologické vyšetrenie neodhalilo ani pri klinickom, ani pri EKG vyšetrení patologické nálezy (abnormality v ST-T úseku, hypertrofiu ľavej komory, arytmie). Hunter – Wolfov A/B „rating scale“ v modifikácii podľa Skorodenského sme použili u 58 detí starších ako 10 rokov k určeniu typu A správania, ktorý sme zistili u 27 detí (46,6 %). U všetkých detí sme vyšetřili lipidový profil, vypočítali aj indexy aterogenity. Okrem týchto parametrov sme stanovili ešte koncentráciu apoB a Lp (a). Oba parametre sa štatisticky významne odlišovali od normy ($p < 0,01$). Podľa hodnôt TCH sme deti rozdelili na dve skupiny – normolipemickú (NL) a hyperlipemickú (HL). Rozdiely medzi normo – a hyperlipemickou skupinou vo všetkých sledovaných parametroch potvrdili štatistickú významnosť na hladine $p < 0,001$. V tabuľke 1 uvádzame ich hodnoty, vrátane indexov aterogenity.

Podrobnejšou analýzou sme zistili dyslipoproteinémiu u 56 detí (59,6 %).

Tab.1 Hodnoty sérových lipidov a aterogénne indexy

Parameter	Priemerné hodnoty	Deti s NL	Deti s HL	p
Počet detí	94	71	23	
Kontrolná skupina	80	68	12	
TCH	4,51 ± 0,95	4,12 ± 0,78	5,85 ± 0,46	< 0,01
	4,02 ± 0,91	3,75 ± 0,55	5,70 ± 0,31	< 0,01
HDL	1,45 ± 0,22	1,44 ± 0,21	1,21 ± 0,1	
	1,44 ± 0,21			
LDL	2,80 ± 0,81	2,64 ± 0,52	3,75 ± 0,66	< 0,01
TG	0,87 ± 0,40	0,84 ± 0,40	1,47 ± 0,29	< 0,01
	1,16 ± 0,60	0,91 ± 0,33	1,45 ± 0,33	< 0,01
LDL/HDL	1,93 ± 0,52	2,25 ± 0,62	3,09 ± 0,75	< 0,01
HDL/TCH	0,32 ± 0,005	0,34 ± 0,006	0,20 ± 0,03	< 0,01
ApoB	76 ± 6	79 ± 5	82 ± 12	
Lp(a)	15 ± 4	16 ± 6	17 ± 7	

Za normálne hodnoty sme pokladali : TCH do 5,20 mmol/L, HDL >1,40 nmol/l, LDL < 2,60 mmol/ L, TG < 1,10 mmol/L, TK do 10 r. – 130/70 torr, TK 11 – 16 r. -140/ 80 torr. T4 – 65 - 165 nmol/L, TS4 do 5 uU/mL.

Súčasne sme stanovovali vysokomolekulárne endogénne antioxidanty a to Cp a Tf. Z nízkoendogénnych antioxidantov sme stanovili vitamín C a E. Ich úloha v oxidačných procesoch ešte stále nás nabáda k preskúmaniu mechanizmov oxidácie voľným kovovým iónom. Ceruloplazmín je silným katalyzátorom LDL oxidácie in vitro. V našom súbore sme zistili jeho zvýšené hodnoty u 21 detí (22,3 %). Transferín je proteín krvnej plazmy, viaže atómy železa – Fe – (III) a jeho kapacita je naplnená na 20 - 30 %. Pôsobí antioxidantne pretože inhibuje tvorbu (OH) a peroxidáciu lipidov. Jeho zvýšené hodnoty sme zistili u 34 detí (36,2 %). Hodnoty vitamínu E sa pohybovali vo fyziologickej norme. Prekvapili znížené hodnoty vitamínu C aj zo zreteľom na sezónnosť, a to u 52 detí (55,3 %).

Diskusia

Viacere štúdie na tému kardiovaskulárne ochorenie verzus detský vek sústreďujú pozornosť predovšetkým na parametre lipoproteínového metabolizmu. Naše čiastkové výsledky ukazujú, že okruh rizikových parametrov musí byť širší. Anamnestické údaje môžu odhaliť závažnosť predispozičných faktorov. Rizikové faktory zohrávajú v patogenéze aterosklerózy u mladej generácie oveľa významnejšiu úlohu než u generácií starších – napríklad dĺžka a intenzita pôsobenia (Rodenburg, 2004). V zásade platí, že viac je ohrozený ten, u ktorého sa vyskytuje väčší počet rizikových faktorov – riziko s vekom, toxicitou environmentu stúpa geometrickým radom (Hyánek a kol., 1995, Wald et al., 2007). V našom súbore sme u cca 2/3 vyšetovaných našli popri familiárnej záťaži ešte ďalšie závažné rizikové faktory (Šaligová a kol., 2005, Žofčáková a Kuchta, 2005). U 11 detí (11,7 %) sme okrem familiárnej záťaže nezistili ďalšie rizika procesu. Obezitu rôzneho stupňa sme našli u viac ako 33 % čo upozorňuje na významne vyšší výskyt ako v kontrolnej skupine. U obéznych detí sa za krátky čas môžeme stretnúť s hyperurikémiou, ale hlavne s hyperinzulinémiou, ktorá evokovaním metabolického syndrómu urýchľuje vývin kardiovaskulárnych ochorení (Kollár, 2002). Výskyt obezity v pubertálnom veku sa odrazí na zvýšenom riziku mortality v strednom veku. Hodnoty krvného tlaku a výskyt artériovej hypertenzie v našom súbore je veľmi blízky hodnotám u obéznych detí. Vzhľadom k tomu, že Vsl. región bol regiónom endemického výskytu hypotyreózy sústredili sme pozornosť na detekciu tyreopatií, ktoré často koincidujú s hypercholesterolémiou (Lavin and Nauss, 1997,

Glueck, 1996). Na základe hormonálneho vyšetrenia sa u 13 prípadoch diagnostikovala subklinická forma hypotyreózy, ktorá vplývala na zvýšenie hodnôt TCH a LDL/CH. Ak porovnáme parametre lipoproteínového metabolizmu u probandov nášho súboru s údajmi iných autorov potvrdzujeme rovnaké výsledky. Aj napriek tomu, že hodnoty v tab.1 sú vo fyziologickom pásme, ale skrýva sa v nich rôzne vysoké percento patologických hodnôt. Hyperlipemická skupina je významne početnejšia v skupine s familárnou záťažou. V skupine dievčat a skupine chlapcov sme nenašli signifikantne významné rozdiely. Podrobnou analýzou sme našli u cca 70 % súboru dyslipoproteinemické zmeny, ktoré sa považujú u mladých jedincov za významné ukazovatele zvýšeného rizika predčasných kardiovaskulárnych komplikácií v strednom veku (Rosipal a Debreová, 2011). Viaceré odborné tímy považujú za významné prehodnotiť pri týchto viac menej dobre definovaných kardiovaskulárnych ochoreniach aj kapacitu antioxidantných systémov. Pozornosť na zvýšenú produkciu voľných kyslíkových radikálov sa upriamuje na klinické stavy, pri ktorých dochádza k ischemicko - reperfúznemu syndrómu. Sem sa radí akútny infarkt myokardu, rôzne formy subakútnej či chronickej ischemickej choroby a tiež pri stavoch, ktoré sú späté s hypoxiou a ischémiou ako aj pri patogeneze aterosklerózy. Neenzýmové antioxidanty, ceruloplazmín a transferín radíme k plazmovým proteínom s antioxidantnými vlastnosťami (Ďuračková a kol., 1999). Získané poznatky jednoznačne podporujú nutnosť zabezpečenia najoptimálnejšieho antioxidantného statusu u rizikových detí podávaním účinných antioxidantov. Sem radíme aj antioxidantne pôsobiace vitamíny C, E a ďalšie prírodné zdroje antioxidantov.

Záver

Autori v tejto práci dokladujú na základe skúsenosti nepriaznivé výsledky v detskej populácii s ohľadom na zvýšený výskyt dyslipoproteinémií, nadváhy, obezity a artériovej hypertenzie u detí s pozitívnou rodičovskou kardiovaskulárnou anamnézou. Východiskom z tejto situácie je dôsledná prevencia zo strany postihnutých familií, dôraznejšej pediatrickej starostlivosti a zo strany spoločnosti v cielej edukácii a v sociálnoochranných opatreniach.

Literatúra

1. Šaligová I., Schusterová I., Kolár J., Potočnáková D. Obezita u detí so zvýšeným kardiovaskulárnym rizikom. *Ateroskleroza* 2005; 9: 109-113.
2. Hyanek J., Dvořáková J. a spol. Efektivita selektívneho screeningu primárnych dyslipopro u detí z rizikovej populácie rodiča a prarodiča trpiacich cévnymi poruchami aterosklerotického pôvodu. *Čs Pediat* 50; 1995: 652-656.
3. Žofčáková M., Kuchta M. Nadváha a obezita v detskom veku, jej dôsledky a východiská pre prevenciu. *Ateroskleroza*, 2005, 9 (3 -4) s. 134 -139.
4. Kollár J. Obezita, primárny rizikový faktor .VII. časť *Ateroskleroza* 6; 2002: 189-207.
5. Rosipal Š., Debreová M. Screening and Treatment for Pediatric Dyslipoproteinemias Regarding the Premature Atherosclerosis in Clinical Practise. The Slovak Guideline. *Ateroskleroza* 2011; 15: 85-94.
6. Wald D.S., et al. Child – parent sreening for familial hypercholesterolemia: screening strategy based on a meta – analysis. *BMJ* 2007; 335(7620): 573-574.
7. Rodenburg J., et al. Familial hypercholesterolemia in children. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 405-411.
8. Ďuračková Z., Bergendi E., Čársky J. Voľné radikály a antioxidanty v medicíne (II) *Slovak academic press* 1999, 315 s.
9. Lavin A., Nauss A.H. Hypothyroidism in otherwise healthy hypercholesterolemie children. *Pediatrics* 1997; 88: 332-334.
10. Glueck Ch.J. Pediatric primary prevention of atherosclerosis. *New Engl J Med* 1996; 314: 175-177.

Práca podporovaná grantom VEGA: 1/0456/11

LIVER STEATOSIS AND HYPERCHOLESTEROLEMIA - A RARE DIAGNOSIS**L. Ťoukálková***Children's department, Krajská nemocnice T. Bati, a.s. Zlín*

The boy born in 1995 suffered from a traumatic perforation of the intestine. The liver steatosis was revealed during the operation, histological specimen was obtained and the steatosis was confirmed.

The lipid spectrum showed hypercholesterolemia and the boy was referred and treated in the lipid ambulance. A hepatopathia appeared only during the year 2010 and a suspicion of the storage disease aroused.

The examination of the acid lysosomal lipase showed only 10 % of the normal value and thus was confirmed, that the boy had been suffering from CESD – the cholesteryl ester storage disease in fact. The second look at the original histological specimen showed the micro vesicular steatosis in the expanded lysosomal system, which is also typical pro CESD.

The cholesteryl ester storage disease is a rare metabolic disorder. Its form called Wolman's disease has a more severe course with the symptoms since early infancy. There are about fifty cases described till now in the Czech Republic.

It is a favorable chance, that our patient was luckily diagnosed at the moment of the start of the multicentre study with experimental ERT – enzyme replacement therapy with the specific recombinant enzyme. The boy is treated with the statin till now. This therapy has a very good effect on the blood lipid levels and also the toleration of this treatment is excellent. This type of the medication is overall recommended but there is the lack of the evidence that it is diminishing the amount of the cholesteryl ester stored in the liver.

Thanks to cooperating institutions

Prof. MUDr. Josef Hyánek, DrSc. Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie,
Nemocnice Na Homolce, Praha

Prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc. 1. LF UK a VFN Praha, Ústav dědičných metabolických
poruch

Ing. Helena Poupětová, 1. LF UK a VFN Praha, Ústav dědičných metabolických poruch

Doc. MUDr. Tomáš Honzík, PhDr. 1. LF UK a VFN Praha

STEATÓZA JATERNÍ A HYPERCHOLESTEROLEMIE - VZÁCNÁ DIAGNÓZA**L. Ťoukálková***Dětské oddělení, Krajská nemocnice T. Bati, a.s. Zlín*

Chlapec narozen v roce 1995 utrpěl v osmi letech traumatickou perforaci tenkého střeva. Peroperačně byla zjištěna steatóza jaterní, která byla histologicky potvrzena. Vyšetření hladiny lipidů v séru prokázalo hypercholesterolémii a chlapec byl dále sledován a léčen v lipidové poradně. V roce 2010 byla zaznamenána mírná hepatopatie a vzniklo podezření na střádavé onemocnění. Vyšetřením kyselé lysozomální lipázy, jejíž hodnota dosahovala pouhých 10 % normy, bylo zjištěno, že hoch střádá v játrech ester cholesterolu a trpí tedy onemocněním označovaným jako cholesteryl ester storage disease - CESD. Následně se podařilo vyhledat a podrobit druhému čtení i stará sklíčka s histologickými vzorky jaterní tkáně odebrané při operaci. Mikrovesikulární steatóza v expandovaném lysozomálním systému jaterní buňky jednoznačně svědčila pro CESD.

Cholesteryl ester storage disease je vzácné metabolické onemocnění. Vyskytuje se i ve formě označované jako Wolmanova choroba, která probíhá pod závažnějším obrazem a projevuje se již u malých dětí. Doposud bylo v ČR popsáno asi 50 jedinců s touto chorobou.

Shodou náhod zapadá doba diagnózy našeho pacienta do přípravy klinické multicentrické studie experimentální léčby ERT – enzyme replacement terapie specifickým rekombinantním enzymem. Zatím je hoch léčen statinem s velmi dobrým efektem na hladiny lipidů v krvi. Tato hypolipidemická léčba je všeobecně doporučována i dobře snášena, chybí ale důkazy, že snižuje množství v játrech nastřádaného cholesterolu.

Poděkování spolupracujícím institucím

Prof. MUDr. Josef Hyánek, DrSc. Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie,
Nemocnice Na Homolce, Praha

Prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc. 1. LF UK a VFN Praha, Ústav dědičných metabolických
poruch

Ing. Helena Poupětová, 1. LF UK a VFN Praha, Ústav dědičných metabolických poruch.

Doc. MUDr. Tomáš Honzík, PhDr. 1. LF UK a VFN Praha

ROSUVASTATIN INDUCES EXPRESSION OF CYP4A IN HEREDITARY HYPETRIGLYCERIDEMIC RAT

R. Večeřa^{1*}, A. Zachařová¹, Z. Matušková¹, M. Šiller¹, E. Anzenbacherová², P. Anzenbacher¹

¹Department of Pharmacology and ²Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

Introduction

Our work studied the effect of rosuvastatin, one of the fully synthetic statin - HMG-CoA reductase inhibitor, on rat cytochrome P450 4A. This widely used hypolipidemic drug exhibits minimal metabolism via the cytochrome P450 system (Neuvonen et al. 2010). The major substrates for cytochrome P450 4A forms are fatty acids (Okita et al. 2001) which play important role in metabolism of triacylglycerols. Hereditary hypertriglyceridemic rats (HHTg) were used in this study, because represent a model of metabolic syndrome accompanied by hypotriglyceridemia and liver steatosis (Klimes et al. 1995). Rats were fed for 20 days on standard laboratory diet (STD) or high cholesterol diet (HCD, which is STD + 10 % w/w of lard fat and 1% w/w of cholesterol). Rosuvastatin (0.03 %) were administrated with HCD. Western blot analysis and RT-PCR showed that rosuvastatin caused up-regulation of CYP4A on protein and mRNA level. This elevation of rat CYP4A expression by rosuvastatin may be important for intensification of microsomal fatty acid ω -oxidation.

Úvod

Cytochrom P450 4A je jaterní enzym zprostředkující převážně ω -oxidaci mastných kyselin, která je méně výkonná v porovnání s β -oxidací, ale přispívá svou měrou k metabolismu mastných kyselin v játrech. Tento cytochrom P450 je jedním z 18 podskupin rodiny CYP4 (Okita et al. 2001, Desvergne et al. 2006). Je exprimován především v potkaních játrech a ledvinách (Okita et al. 1997). Rosuvastatin patří mezi zcela syntetické statiny a v současné době je často preskribován pacientům s hypercholesterolemií nebo smíšenou hyperlipidemií (Neuvonen et al. 2010). Cílem naší studie bylo zjistit, zda toto hypolipidikum působí na expresi cytochromu P450 4A u hereditárně hypertriglyceridemických potkanů (HHTg) na definované hyperlipidemické dietě.

Výsledky byly získány metodou Western blotu (na úrovni proteinu) a metodou real-time PCR (polymerázová řetězová reakce, na úrovni mRNA). Kontrolně byly vyhodnoceny hladiny lipidů (cholesterolu a triacylglycerolů) v krevní plasmě a jednotlivých lipoproteinových frakcích.

Materiál a metody

Zvířata

Samci HHTg potkanů (270-290g) byli rozděleni do tří skupin (po sedmi jedincích) a krmeni dvacet dní (*ad libitum*) experimentálními dietami. První skupině (kontrolní skupina) byla podávána standardní dieta – STD (ST-1, Velaz s.r.o., Praha, ČR), druhá skupina byla na standardní dietě obohacené o 1% (w/w) cholesterolu (Sigma-Aldrich, Praha, ČR) a 10% (w/w) vepřového sádla (HCD dieta). Třetí skupina byla krmena HCD dietou obohacenou o 0,03% (w/w) rosuvastatinu. Dvacátý první den experimentu byli potkani uvedeni do celkové anestezie (i.m. fentanyl 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, dexmedetomidin 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, diazepam 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), po exsanguinaci z bifurkace břišní aorty byla odebrána játra, vložena na suchý led a zamražena na -70°C pro izolaci jaterních mikrosomů, asi 30 mg jater bylo odebráno do stabilizátoru RNA pro RT-PCR. Krevní plasma byla separována při 6000 g a 4°C po dobu 20 minut.

Odborná etická komise MŠMT schválila projekt pokusu prováděného na těchto zvířatech.

Western Blot

Jaterní mikrosomy byly získány metodou dle Bruyera (2009). Poté byl změřen protein s použitím BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, USA). Separace proteinů byla provedena pomocí SDS-PAGE elektroforézy (s 8% separačním polyakrylamidovým gelem), kde bylo použito 12,5 µg proteinu z každého vzorku, který byl následně zředěn v pufru (62,5 mM TRIS, 10% glycerol, 4% merkaptoethanol, 2% SDS, brilliant blue, pH 6,8) v poměru 1:1, povařen ve vroucí lázni po dobu 5 minut a nakonec zcentrifugován při 3000 otáčkách za minutu. SDS-PAGE elektroforéza probíhala 5 min při 120 V a 40 min při 180 V. Separované proteiny byly přeneseny z gelu na nitrocelulosoovou membránu (Hybond P) dle Towbina (1979). Proteiny na této membráně byly inkubovány s primární protilátkou (Rabbit polyclonal anti 4A1+2+3, Abcam, UK) po dobu 60 min při laboratorní teplotě. Stejnou dobu byly inkubovány se sekundární protilátkou, konjugovanou s křenuvou peroxidázou (goat anti-rabbit, Sigma, ČR). Detekce imunokomplexů byla provedena chemiluminiscenčně za použití WB Luminol Reagent (Santa Cruz, USA) a vyhodnocení bylo provedeno densitometricky za použití softwaru Elfoman (Semecký Inc., Praha, ČR).

Izolace RNA a real-time PCR

30 mg jaterní tkáň z každého vzorku bylo po odebrání uchováno ve stabilizačním roztoku RNA-later (Quiagen, Germantown, MD, USA) při -70°C a poté bylo homogenizováno. Zbytky tkáň byly odstraněny pomocí kolon QIAshredder (Quiagen). RNA byla izolována pomocí Rneasy Plus Minikit (Quiagen) dle standardního protokolu dodaného výrobcem. Koncentrace vyizolované RNA, stejně tak jako čistota RNA, byla zjištěna spektrofotometricky. 1 µg RNA byl následně transformován reverzní transkripcí do cDNA pomocí kitu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Switzerland) a random hexamer primerů. Nasyntetizovaná cDNA byla využita při RT-PCR experimentech, které byly prováděné na přístroji Light Cycler 480 II s originálním softwarem (Roche, Basel, Switzerland) za použití Light Cycler 480 SYBR Green Master I mixu. Experimenty probíhaly za těchto podmínek: 10min při 95°C, následně 45 cyklů 10s při 95°C, 15s při 58°C a 15s při 72°C pro denaturaci, annealing a elongaci. Po každém cyklu byla monitorována a kvantifikována emise fluorescence. Výsledky byly normalizovány k hypoxantin – guanin fosforibosyl transferase (HPRT). Všechny vzorky pro real-time PCR byly měřeny v tripletech. Použité primery byly navrženy na našem pracovišti a syntetizovány firmou Invitrogen (LifeTechnologies, division Prague, Czech Republic). Byly použity následující sekvence primerů:

CYP4A1 Fw 5'- TGCTAGACAAATGGGAACAGGTGGC - 3'

CYP4A1 Rev 5'- TGTCCCCATTCTCCATTCTGGCAAG - 3'

CYP4A2 Fw 5'- GTTATGAAGTGTGCTTTCAGCCA - 3'

CYP4A2Rev 5'- CAACAGCCTTGGTGTAGGACC - 3'

HPRT Fw 5'- GAAGAGCTACTGTAATGACCAGTC - 3'

HPRT Rev 5'- CGTTCTTCCAGTTAAAGTTGAGAGA - 3'

Pro separaci VLDL, LDL a HDL lipoproteinů byla použita metodika ultracentrifugace (Havel et al. 1955). Cholesterol a TAG v plasmě, VLDL, LDL a HDL byly stanoveny enzymaticky použitím Bio-La-Testů.

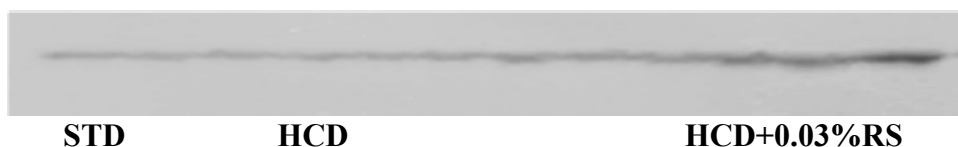
Statistické vyhodnocení dat

Data byla zpracována s použitím testu analýzy rozptylu – ANOVA a následným Studentovým t-testem. Testy byly prováděny při hladině významnosti 0,05.

Výsledky a diskuse

Cytochromy P450 4A (4A1, 4A2 a 4A3) u potkana metabolizují mastné kyseliny tzv. ω -oxidací, stejně jako lidské cytochromy CYP4A11 a CYP4A20. Podle dosavadních výsledků rosuvastatin kromě snižování hladin cholesterolu (inhibicí HMG-CoA reductasy) působí i na snížení hladiny triacylglycerolů (Thongtang et al. 2011, Yanagi et al. 2011). Mechanismus tohoto hypotriglyceridemického účinku není přesně popsán a definován (Kostapanos et al. 2007). V předložené studii jsme sledovali, jestli by snižování hladiny triacylglycerolů rosuvastatinem nemohlo souviset se zvýšenou expresí cytochromu P450 4A. Naše předchozí práce ukázaly, že samotná vysokocholesterolová dieta (HCD) u zdravého potkana kmene Wistar inhibuje expresi cytochromu P450 4A1, 4A2 a 4A3 na úrovni proteinu i mRNA (Orolin et al. 2007). Po podávání vysokocholesterolové diety HHTg potkanům se také snížila exprese CYP4A, ale jejím obohacením o 0,03% rosuvastatinu došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese těchto cytochromů P450 jak na úrovni proteinu tak i mRNA (Fig. 1, 2 a 3). S těmito výsledky koresponduje mírné snížení TAG v plazmě po podávání 0,03% rosuvastatinu HHTg potkanům (neukázáno).

Fig.1.: Expression of CYP4A1+2+3 protein



(STD – standard laboratory diet, HCD – high cholesterol diet, HCD + 0.03% RS - HCD with 0.03 % of rosuvastatin)

Fig. 2.: Expression of CYP4A1 mRNA

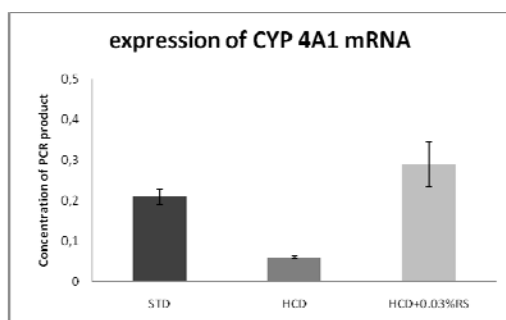
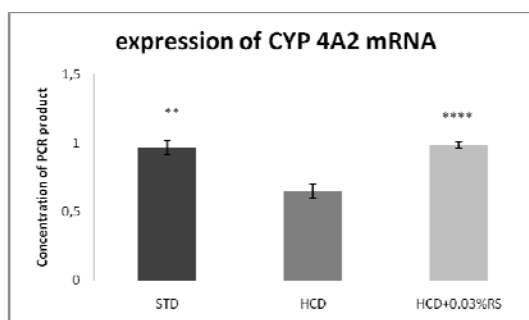


Fig. 3.: Expression of CYP4A2 mRNA



Závěr

Cytochrom P450 4A je enzym zprostředkující tzv. ω -oxidaci mastných kyselin jak u člověka, tak i u potkana. V potkaních játrech se vyskytují celkem čtyři formy tohoto cytochromu P450 - CYP4A1, CYP4A2, CYP4A3 a CYP4A8. Při srovnání cytochromů P450 4A mezi potkanem a člověkem nalezneme jistou strukturální podobnost (asi na 70 - 80 %). Do jisté míry se tedy dá předpokládat, že tyto cytochromy P450 budou sdílet i určitou podobnost po stránce funkční (Okita 2001). Po podávání samotné vysokocholesterolové diety

se mírně snížilo množství cytochromu P450 4A. Pravděpodobně došlo v játrech k oslabení alternativní cesty (ω -oxidace) odbourávání mastných kyselin. Když se tato dieta obohatila o 0,03 % rosuvastatinu, metabolická cesta ω -oxidace se patrně opět otevřela. Zvýšení oxidace mastných kyselin v jaterních buňkách pak pravděpodobně následně vedlo k poklesu sekrece triacylglycerolů z jater, a tedy i ke snížení jejich koncentrace v krvi. Zjištěné výsledky by mohly přispět k objasnění hypotriglyceridemického působení rosuvastatinu.

Literatura

1. Bruyere A, Declèves X, Bouzom F, Proust L, Martinet M, Walther B, et al. Development of an optimized procedure for the preparation of rat intestinal microsomes: comparison of hepatic and intestinal microsomal cytochrome P450 enzyme activities in two rat strains. *Xenobiotica* 2009; 39: 22-32.
2. Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* 2006; 86: 465-514.
3. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345-1353.
4. Klimes I, Vrána A, Kunes J, Seböková E, Dobesová Z, Stolba P, Zicha J. Hereditary hypertriglyceridemic rat: a new animal model of metabolic alterations in hypertension. *Blood Press* 1995; 4: 137-142.
5. Kostapanos MS, Milionis HJ, Filippatos TD, Nakou ES, Bairaktari ET, Tselepis AD, Elisaf MS. A 12-week, prospective, open-label analysis of the effect of rosuvastatin on triglyceride-rich lipoprotein metabolism in patients with primary dyslipidemia. *Clin Ther* 2007; 29: 1403-1414.
6. Neuvonen PJ. Drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors (statins): the importance of CYP enzymes, transporters and pharmacogenetics. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11: 323-332.
7. Okita JR, Johnson SB, Castle PJ, Dezelle SC, Okita RT. Improved separation and immunodetection of rat cytochrome P450 4A forms in liver and kidney. *Drug Metab Dispos* 1997; 25: 1008-1012.
8. Okita RT, Okita JR. Cytochrome P450 4A Fatty Acid Omega Hydroxylases. *Curr Drug Met* 2001; 2: 265-281.
9. Orolin J, Večeřa R, Jung D, Meyer UA, Škottová N, Anzenbacher P. Hypolipidemic effects of silymarin are not mediated by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Xenobiotica* 2007; 37: 725-735.
10. Thongtang N, Ai M, Otokozawa S, Himbergen TV, Asztalos BF, Nakajima K, Stein E, Jones PH, Schaefer EJ. Effects of maximal atorvastatin and rosuvastatin treatment on markers of glucose homeostasis and inflammation. *Am J Cardiol* 2011; 107: 387-392.
11. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4353.
12. Yanagi K, Monden T, Ikeda S, Matsumura M, Kasai K. A crossover study of rosuvastatin and pitavastatin in patients with type 2 diabetes. *Adv Ther* 2011; 28: 160-171.

Autoři děkují za finanční podporu grantu GAČR 305/09/1177, GAČR 303/09/H048 a LF2011-005

ZKUŠENOSTI S NUTRIČNÍ PODPOROU U ONKOLOGICKÝCH PACIENTŮ S KARCINOMEM JÍCNU

M. Zemanová

Onkologická klinika 1. LF UK a VFN Praha

Nutriční podpora je nezbytnou součástí podpůrné léčby onkologických pacientů. Více publikací prokázalo, že v terminálních fázích malignity je častou příčinou úmrtí malnutrice a kachexie. Nutriční skrínink u onkologických pacientů by měl být standardní součástí péče ve všech centrech. Příčiny malnutrice jsou multifaktoriální, toto sdělení se zaměří na případy nádorového postižení horní části trávicí trubice, kdy hlavní příčinou malnutrice je mechanická překážka v příjmu potravy. Standardem léčby nemocných s karcinodem jícnu je předoperační konkomitantní chemoradioterapie a chirurgická resekce, realizovaná často jako dvoudutinový výkon. Tento multimodální postup patří k nejnáročnějším v onkologii s publikovanou perioperační úmrtností kolem 10 %. Nepříznivý nutriční stav nemocných s karcinodem jícnu je velmi častým jevem a častěji než u jiných malignit může být průnikem více kauzálních vlivů. V první řadě u nemocných s karcinodem jícnu vede progredující dysfagie trvající někdy řadu měsíců k významnému poklesu váhy, přibližně v 30 % – 50 % případů překračující 10kg nebo 10 % tělesné hmotnosti. U části nemocných je přítomen astenický habitus při abusu alkoholu, kouření a nesprávných stravovacích návycích již před vznikem dysfagie. Na poklesu váhy se může podílet i nádorová kachektizace v důsledku pokročilého onemocnění. U přibývajících adenokarcinomů v oblasti kardie může být malnutrice maskována tím, že tito pacienti byli před onemocněním obézní. Úbytek hmotnosti více než 10 % za 3 - 6 měsíců před diagnózou nádorového onemocnění je považován za nepříznivý prognostický faktor a pokračujícím úbytkem je úspěšné dokončení léčebného postupu včetně radikální operace ohroženo. U významné části nemocných (cca 30 %) dochází v důsledku konkomitantní chemoradioterapie k přechodnému zhoršení dysfagie v důsledku poradiační ezofagitidy. Zvracení a nevolnost po chemoterapii také může ztrátu na váze prohlubovat. Podle závažnosti malnutrice a dysfagie byla u našich pacientů indikována nutriční intervence, nejčastěji kombinace mleté nebo mixované výživné diety s bílkovinnými přísadami, podle potřeby s doplňkovým sippingem definovanou tekutou výživou (oral nutritional supplements – ONS). Provedení gastrostomie k zajištění výživy není u nemocných s karcinomy jícnu vhodné, protože intaktní žaludek je potřebný k rekonstrukci polykací trubice. U pacientů s těžkou dysfagií, která neumožňovala dosáhnout dostatečného příjmu energií a tekutin, byla indikována umělá výživa tenkou nasogastrickou sondou (NGS) s použitím polymerních definovaných preparátů enterální výživy, případně parenterální výživy. Paralelně probíhala rehabilitace příjmu per os pomocí tekuté výživy. V případě, že se podařilo dosáhnout plánovaného energetického příjmu 8 - 10 000 kJ perorálně, byla výživa sondou přerušena. Všichni pacienti, kteří odmítli zavedení sondy, byli nakonec hospitalizováni v průběhu chemoterapie pro komplikace v souvislosti s nedostatečným příjmem potravy a tekutin per os s nutností parenterální výživy. U nemocných s těžkým stupněm dysfagie byl tento parametr prokázán jako nepříznivý prognostický faktor pro přežití i dobu do progresu, jen třetina těchto pacientů podstoupila kurativní resekci, s 50% pooperační mortalitou. To ukazuje na potřebu důrazu na provedení předoperační a perioperační nutriční podpory u pacientů s rozvinutou podvýživou, zejména v případě anamnézy těžké dysfagie.

KOMBINOVANÉ PŮSOBENÍ KALORICKÉ RESTRIKCE A POLYNEENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN ŘADY N-3

P. Zouhar

Fyziologický ústav AV ČR, Praha

Polynenasycené mastné kyseliny řady n-3 (n-3 PUFA), široce zastoupené zejména v oleji mořských ryb, jsou známy svými hypolipidemickými účinky. Jejich užívání snižuje rovněž riziko kardiovaskulárních onemocnění a může předcházet rozvoji obezity a insulinové rezistence. Obezita přitom může být vnímána jako stav chronického zánětu tukové tkáně. Jedním z mechanismů účinku preparátů z rybího oleje je konverze n-3 PUFA na protizánětlivé eikosanoidy a příbuzné lipidové mediátory. n-3 PUFA však kromě toho prostřednictvím jaderných receptorů z rodiny PPAR ovlivňují také expresi řady důležitých genů.

I přes nadějně výsledky je účinnost n-3 PUFA v praxi limitována. Proto se v současnosti hledají další léčebné přístupy, které by mohly efekt n-3 PUFA umocnit. Jedním z takových zásahů by mohlo být i omezení kalorického příjmu. Kalorická restrikce představuje základní strategii při léčbě obezity a chorob s obezitou spojených. Zároveň bylo na mnoha modelových organismech prokázáno, že omezení kalorického příjmu zpomaluje stárnutí. Klíčovou drahou je v tomto případě zřejmě regulace aktivity deacetylasy Sirt1.

V minulosti byl zkoumán většinou vliv výrazné (až 50 %) kalorické restrikce. V kombinaci s přídatkem n-3 PUFA se však nabízí možnost kalorickou restrikci zmírnit. K testování účinnosti obou postupů byl navržen následující experiment:

Myši kmene C57BL/6J byly rozděleny do 4 pokusných skupin: (1) myši krmené kontrolní vysokotukovou dietou ad libitum, (2) myši krmené vysokotukovou dietou s přídatkem koncentrátu n-3 PUFA (15 % lipidů v dietě), (3) myši na 10 % kalorické restrikci krmené kontrolní vysokotukovou dietou a (4) myši na 10% kalorické restrikci krmené vysokotukovou dietou s přídatkem koncentrátu n-3 PUFA. V průběhu pokusu byl proveden orální glukosový toleranční test. Po šesti týdnech byla zvířata usmrcena a proběhly analýzy metabolického obratu, genové exprese a hladiny metabolitů v plazmě.

V porovnání s kontrolní skupinou kombinované působení n-3 PUFA a kalorické restrikce průkazně zvyšuje citlivost k insulinu (vyjádřenou HOMA indexem) i glukosovou toleranci (jakožto plochu pod glykemickou křivkou při orálním glukosovým tolerančním testu). Dále byla pozorována výrazně zvýšená produkce protizánětlivých lipidových mediátorů, zejména 15-deoxy- $\Delta^{12,15}$ -prostaglandinu J2 a neuroprotectinu D1. Následkem toho je rovněž snížena infiltrace makrofágů do tukové tkáně, jak prokázala histologická analýza.

Stejně tak vykazovala kombinovaná skupina snížené ektopické ukládání lipidů v játrech a svalech. Toto pozorování by mohlo být vysvětleno skutečností, že n-3 PUFA a kalorická restrikce vykazovaly výrazný aditivní efekt na oxidaci mastných kyselin a celkovou oxidativní kapacitu mitochondrií v gonadální tukové tkáni. V souladu s tímto výsledkem byla zjištěna rovněž zvýšená exprese markerů mitochondriální biogeneze a β -oxidace.

Souběžný experiment s heterozygotní myší linií Sirt1^{+/-} naznačil, že deacetylasy Sirt1 je nutná pro zprostředkování benefičního účinku n-3 PUFA. Kalorická restrikce a n-3 PUFA by tak mohly částečně působit přes společnou signalizační dráhu.

V každém případě se ukázal výrazný potenciál kombinovaného působení mírné kalorické restrikce a n-3 PUFA při léčbě poruch spojených s obezitou. Podstatou účinku kombinovaného působení je patrně navození stavu zvýšeného spalování mastných kyselin v tukové tkáni a produkce protizánětlivých lipidových mediátorů.

ROLE OF PERIVASCULAR FAT TISSUE IN THE DEVELOPMENT OF CARDIOVASCULAR DISORDERS

J. Ždychová, I. Lesná-Králová, L. Kazdová

Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague

Abstract

Although virtually all blood vessels are surrounded by various amounts of adipose tissue and perivascular adipocytes have been demonstrated to be powerful endocrine cells capable of responding to metabolite cues and transducing signals to adjacent blood vessels and may be moreover involved in local stimulation of atherosclerotic plaque formation. Until recently perivascular fat tissue (PVAT) has been virtually ignored during the studies of vascular function. This is no longer the case as emerging evidence suggests that PVAT regulates vascular function via at least three key aspects: inflammation, vasoreactivity, and smooth muscle cell proliferation.

Tradičně vnímanou a zmiňovanou funkcí tukové tkáně je její funkce tepelně-izolační, poskytování mechanické ochrany vnitřním orgánům a především pak její funkce energetické rezervy. V dnešní době je tuková tkáň stále častěji vnímána i jako významný endokrinní a imunologicky aktivní orgán produkující řadu bioaktivních látek s apokrinním, parakrinním i endokrinním účinkem zasahujících do regulačních dějů v organismu a potenciálně se uplatňujících v procesu patogeneze metabolického syndromu a kardiovaskulárních onemocnění (Matsuzawa 2006, Trayhurn 2005, Teramoto 2008). Na základě klinických pozorování je známa úloha lokalizace tukové tkáně v tomto procesu. Hromadění viscerálního tuku v oblasti břicha, tzv. centrální nebo také androidní obezita, je z hlediska kardiovaskulárních komplikací považováno za více rizikové než nárůst podkožního tuku v oblasti boků a hýždí (tzv. gynoidní obezita). Zvýšení objemu viscerálního tuku má za následek tzv. negativní aterogenní dyslipoproteinemii (tj. významnému zvýšení na triglyceridy bohatých lipoproteinů, nízkým hodnotám HDL (high density lipoprotein) cholesterolu, a zvýšení hodnot tzv. denzní fenotyp LDL částic (Hamdy 2006). Navíc, je to právě viscerální tuková tkáň, která u obézních jedinců produkuje, v porovnání s subkutánní tukovou tkání, více prozánětlivých cytokinů (Einstein 2005). Tyto změny související s obezitou jsou zásadní pro vznik proinflamačního stavu. Je prokázáno, že akumulace tukové tkáně vede k lokálnímu zvýšení počtu makrofágů a to zejména jejich proinflamačního M1 subsetu. Makrofágy uplatňující se v procesech buněčné obrany, zánětu a jiných imunologických dějích představují velmi heterogenní buněčnou populaci. Na základě in vitro studií byly definovány dvě populace makrofágů - proinflamační M1 makrofágy, stimulované např. lipopolysacharidem nebo interferonem gama, a alternativně aktivované M2 protizánětlivé makrofágy. Zdá se, že právě změna v poměru zastoupení obou subpopulací makrofágů je při nárůstu obezity klíčová a vede nejen ke zmiňovanému proinflamačnímu stavu s ní spojenému, ale i ke snížené citlivosti adipocytů k inzulínu (Lumeng 2007).

Prakticky všechny cévy jsou obklopeny určitým množstvím tukové tkáně (Cinti 2002). Perivaskulární tuková tkáň (PVT) byla až doposud považována spíše za pasivní strukturální oporu cév. Dnes je již známa nejen její vasokrinní funkce (Gao 2007), ale na základě recentních dat se zdá, že podobně jako viscerální tuková tkáň, produkuje také PVT řadu biologicky aktivních mediátorů. Dysfunkce PVT, skrze tyto mediátory, lokálně ovlivňuje prostředí cévní stěny, indukuje zánět a podílí se tak na rozvoji vaskulárních onemocnění souvisejících s obezitou. Zde je potřeba zdůraznit, že PVT není od vaskulární stěny oddělena

fascií nebo elastickou vrstvou a může tak přímo zasahovat do oblasti adventicie (Chatterjee 2009). Lze tedy předpokládat, že díky absenci bariery a anatomické blízkosti mohou mediátory tvořené v PVT významně ovlivňovat lokální prostředí cévní stěny prostřednictvím parakrinní, případně vasokrinní signalizace. Perivaskulární adipocyty se morfologicky i funkčně liší od viscerálních nebo subkutánních adipocytů. V porovnání s nimi mají mnohem heterogennější tvar, menší velikost, vykazují nižší stupeň diferenciacce a liší se i genovou expresí chemokinů. (Chatterjee 2009). Z nedávných studií pak navíc vyplývá, že PVT vykazuje biologickou a funkční diverzi i v závislosti na lokalizaci a je kombinací bílé a hnědé tukové tkáně (Police 2009). Z výše uvedených poznatků lze vyvodit závěr, že PVT ovlivňuje vaskulární funkce prostřednictvím několika paraelně působících mechanismů. Mezi nejdůležitější patří: 1/ modulace zánětu, 2/ modulace vasoreaktivitu a 3/ proliferace buněk hladkého svalstva cév.

1/ Úloha PVT při modulaci zánětu

PVT je tvořena jak adipocyty, tak tkáňovými makrofágy, přičemž oba zmíněné buněčné typy se vzájemně ovlivňují. Prostřednictvím zpětných vazeb dochází ke změnám sekrece mediátorů, adipokinů a cytokinů, majících pro i protizánětlivé účinky. Mezi významné prozánětlivé mediátory produkované PVT patří adipokiny leptin a rezistin spolu s cytokiny IL-6, IL-8, plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) atd. Významnými protizánětlivým adipokinem je např. adiponektin. Je to právě porušení rovnováhy mezi pro/ protizánětlivými chemokiny, související s metabolickým stavem, co se zdá být určující pro vznik PVT dysfunkce mající za následek zvýšenou infiltraci zánětlivými buňkami, prohloubení stavu dysfunkce spojené s dalším snížením exprese protizánětlivých a zvýšením exprese prozánětlivých mediátorů, které následně lokálně ovlivňují cévní stěnu a přispívají tak k rozvoji aterosklerozy. V literatuře je dokonce pro tento mechanismus působení v procesu patogeneze vaskulárních onemocnění zaveden termín "*outside to inside* signalling". Např. Chatterjee (2009) ve své práci uvádí, že dysfunkce PVT vyvolaná krátkodobým podáváním vysokotukové diety u zvířecího modelu má možnou souvislost s metabolickým stavem asociovanou poruchou genové exprese.

2/ Parakrinní efekt PVT na vasoreaktivitu

Nedávné studie přinesly důkazy o tom, že PVT a endotel ovlivňují vaskulární tonus jak vzájemně zcela nezávislými mechanismy, tak procesy, ve kterých jsou zapojeny obě tyto složky. Zdá se, že za fyziologických podmínek produkuje PVT doposud nedefinovaný „adipocyte-derived relaxing factor“ (ADRF), který aktivuje na ATP závislé K⁺ kanály v hladkých svalech cév, čímž dojde k hyperpolarizaci jejich membrány a následné vasodilataci (Gao 2005, Löhn 2002). Výsledky dále naznačují, že k této ADRF podmíněné vasorelaxaci dojde jen v podmínkách, kdy je přítomen rovněž endotel. Lze tedy předpokládat, že v tomto procesu je zapojen oxid dusnatý, jehož biologická dostupnost je za těchto podmínek zvýšena (Greenstein 2009). Několik posledních studií pak přináší důkazy o vasodilatačním mechanismu nezávislém na endotelu, kdy v PVT tvořené reaktivní formy kyslíku přímo inhibují kontraktivitu buněk hladkých svalů cév prostřednictvím guanylyl cyclazy (cGC) (Gao 2007a, Löhn 2002, Hayabuchi 1998)

3/ Vliv PVT na proliferaci buněk hladkých svalů cév

Je známo, že vzorky tzv. conditioned media“, tj. media získaného po 24 hodinové inkubaci s kulturou adipocytů, stimuluje v kultuře proliferaci buněk hladkého svalstva cév (VSCM), což svědčí o parakrinním vlivu adipocytů na buňky VSCM. (Barandier 2005). In vivo byl modulační vliv PVT studován např. Takaokou (2009). Z této práce využívající transplantaci subkutánního nebo perivaskulárního tuku zvířat s vysokou nebo vysokosacharidovou

dietou kolem femurální tepny zbavené PVT vyplývá, že perivaskulární tuk působí za basálních podmínek protektivně a snižuje tvorbu neointimy po cévním poranění. Dysfunkce vyvolaná podáváním příslušné diety pak naznačila možnou souvislost mezi metabolickým stavem, poruchou exprese genů asociovaných s adipocyty a zvýšenou tvorbou neointimy v podmínkách in vivo.

Závěr

Za současného stavu poznání se zdá, že se PVT podílí jak na udržení vaskulární homeosázy, tak, v případě dysfunkce, významně ovlivňuje rovněž patogenezi vaskulárních onemocnění. Řada otázek souvisejících s biologií PVT však zůstává dosud nevyřešena. K jejich objasnění bude třeba provést celou řadu studií využívajících např. transplantace PVT u modelů vaskulárních chorob a aterosklerozy. A konečně, jelikož PVT pravděpodobně přispívá k patogenezi cévních onemocnění, z tohoto důvodu se zdá být budoucí využití genových intervencí a lokální perivaskulární terapie velmi prospěšné při léčbě aterosklerozy nebo post-angioplastických restenozí (Miao 2011).

Literatura:

1. Barandier C., Montani JP., Yang Z. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(5): H1807-H1813.
2. Cinti S. *J Endocrinol Invest* 2002; 25(10): 823-835.
3. Chatterjee TK., Stoll LL., Denning GM., et al. *Circ Res* 2009; 104(4): 541-549.
4. Einstein FH., Atzmon G., Yang XM., et al. *Diabetes* 2005; 54(3): 672-678.
5. Gao YJ., Zeng ZH., Teoh K., et al. *Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130(4): 1130-1136.
6. Gao YJ. *Curr Pharm Des* 2007; 13(21): 2185-2192.
7. Gao YJ., Lu C., Su LY., et al. *Br J Pharmacol* 2007; 151(3): 323-3231.
8. Greenstein AS., Khavandi K., Withers SB., et al. *Circulation* 2009; 119(12): 1661-1670.
9. Hamdy O., Porramatikul S., Al-Ozairi E. *Curr Diabetes Rev* 2006; 2(4): 367-373.
10. Hayabuchi Y., Nakaya Y., Matsuoka S., Kuroda Y. *Heart Vessels* 1998; 13(1): 9-17.
11. Löhn M., Dubrovská G., Lauterbach B., et al. *FASEB J* 2002; 16(9): 1057-1063.
12. Lumeng CN., Bodzin JL., Saltiel AR. *J Clin Invest* 2007; 117(1): 175-184.
13. Matsuzawa Y. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3(1): 35-42.
14. Miao CY., Li ZY. *Br J Pharmacol* 2011 Apr 6. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01404.
15. Police SB., Thatcher SE., Charnigo R., et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(10): 1458-1464.
16. Takaoka M., Nagata D., Kihara S., et al. *Circ Res* 2009; 105(9): 906-911.
17. Teramoto T., Sasaki J., Ueshima H., et al. *J Atheroscler Thromb* 2008; 15(1): 1-5
18. Trayhurn P. *Acta Physiol Scand* 2005; 184(4): 285-293.

Podpořeno prostředky grantových projektů MZO 00023001 a P301/11/2418

FIRST EXPERIENCE WITH ROUTINE USE OF TREDAPTIVE IN PATIENTS SUFFERING FROM DYSLIPIDEMIAS IN LIPID METABOLIC SURGERY

J. Hyánek, L. Dubská, L. Táborský, J. Privarová

Lipid Metabolic Surgery on Dept. Clin. Biochemistry, Haematology and Immunology Hospital Homolka, Prague,

Goal: to establish the practical therapeutic value and significance of routine use of Tredaptive in patients of our lipid metabolic surgery.

Patients and Methods: in 27 adult patients at the age of 25 - 75yrs with lipid profile corresponding to the familiar hypercholesterolemia and mixed dyslipidemia. Tredaptive has been used. Mean follow-up was 6 mts. 1-2g of Tredaptive/d was used in patients possessing so called „residual risk of CVD“, by intensive targeted treatment with statins combined with ezetimibe where elevated Lp(a) over 1000 mg/l was proved or where appeared „moderate triglyceridemia“ over 3 mmol/l resistant to the fibrates.

For monitoring the classical spektrum of lipid markers has been used (i.e. TC, LDL-C, HDL-C, non-cholesterol, sdLDL, Lp(a), apoB, apoA1); blood sample collection in 3 - 4 mts intervals.

Results: 50 % of selected patients refused the treatment with Tredaptive immediately after careful studying of information pamphlet with reference to 20 different side-effects given in pamphlet. 20 % of patients refused this kind of treatment after first week of experimental use of 1g/d with reference to same above mentioned side-effects. 30 % of patients tolerated 1g/d of Tredaptive without any significant side effects, but only in half of them the decrease of Lp(a) has been achieved; the increase of daily dose to 2g/d of Tredaptive was more effective. Clinical cases of some typical patients and monitoring curves of important lipid markers are discussed in details.

Conclusions: short term use of 1g Tredaptive/d is not enough effective for significant decrease of high Lp(a) plasma values; 2g/d given were more effective. The effect on hypertriglyceridemia was not significant and remains problematic. Number of patients is too small to give any practical recommendations!

Key words: Familial Hypercholesterolemia, Mixed Dyslipidemia, Tredaptive, Treatment

email: josef.hyanek@homolka.cz

„intensive targeted treatment“ means the desired total cholesterol plasma level 4,8 mmol/l

ANTIOXIDAČNÍ ENZYMY A KARCINOM PANKREATU**ANTIOXIDANT ENZYMES AND THE CARCINOMA OF PANCREAS****Kodydková J., Vávrová L., Macášek J., Krechler T., Žák A.***IV. interní klinika, 1. lékařská fakulta UK a VFN v Praze***Úvod**

Karcinom pankreatu (KP) je nádor s infaustní prognosou a vzrůstající incidencí. Histologicky se v 85% jedná o duktální adenokarcinom. Etiopatogeneze KP je multifaktoriální a zahrnuje vlivy zevního prostředí (kouření, alkohol, zvýšený příjem tuků, obesita), získané genetické i non-genetické poruchy (diabetes) i vliv genetické dědičné zátěže (hereditární pankreatitis), z nichž některé rovněž ovlivňují oxidační rovnováhu organismu (1).

Redoxní rovnováha organismů je kontrolována různorodou skupinou látek nazývanou antioxidanty, které i ve velmi malých koncentracích zabráňují oxidaci nestabilních substrátů. Antioxidační ochrana probíhá na třech úrovních - primární ochrana, která spočívá v zabránění tvorby reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS); sekundární ochrana spojená s neutralizací již vzniklých RONS a terciální ochrana, která se týká opravy oxidačního poškození biomolekul (2). Podle charakteru je možno rozdělit antioxidanty na enzymové a neenzymové. Mezi nejdůležitější antioxidační enzymy se řadí superoxiddismutasa (SOD), katalasa (CAT), glutathionperoxidasa (GPX), glutathionreduktasa (GSH) a paraoxonasa (PON). Hlavní funkcí antioxidačních enzymů je odstranění vzniklých RONS (3).

Cílem této studie bylo rozšíření a optimalizace diagnostiky oxidační zátěže u pacientů s karcinomem pankreatu.

Materiál a metody*Soubor nemocných*

Do studie bylo celkem zařazeno 64 pacientů s potvrzeným KP vyšetřených na IV. interní klinice 1. LF UK a VFN v Praze. Do skupiny zdravých kontrol (KON) bylo zařazeno 64 osob na základě věku a pohlaví. Diagnóza KP byla založena na doporučených diagnostických postupech, které zahrnovaly spirální CT, ERCP a endoskopickou ultrasonografií. Verifikace KP byla prováděna histologicky (punkční biopsie, histologie resekováného KP po chirurgickém výkonu). Pro obě skupiny platila následující vylučovací kritéria: zavedená terapie antioxidanty (farmakologické dávky vitamínu C a E, allopurinol, N-acetylcystein), chronická dialýza a imunosuprese. Všichni účastníci výzkumu podepsali informovaný souhlas se zařazením do studie.

Laboratorní analýzy

Všem pacientům zařazeným do klinické studie byly odebrány vzorky krve po celonočním lačnění. Stanovení základních biochemických parametrů v séru bylo provedeno v centrálních laboratořích VFN Praha pomocí komerčních setů na automatických analyzátořech. Aktivita antioxidačních enzymů byla stanovována v hemolysovaných erytrocytech pomocí kinetických spektrofotometrických metod (4). Vzorky před analýzou byly skladovány při - 80°C. Jako marker oxidačního stresu byla měřena koncentrace konjugovaných dienu v precipitovaných LDL (CD/LDL) (5).

Statistika

Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Statistické zpracování bylo provedeno v programu Statistica verze 8.0 (Statsoft, 2007) s použitím t-testu. Výsledky byly považovány za statisticky významné při $p < 0,05$.

Výsledky

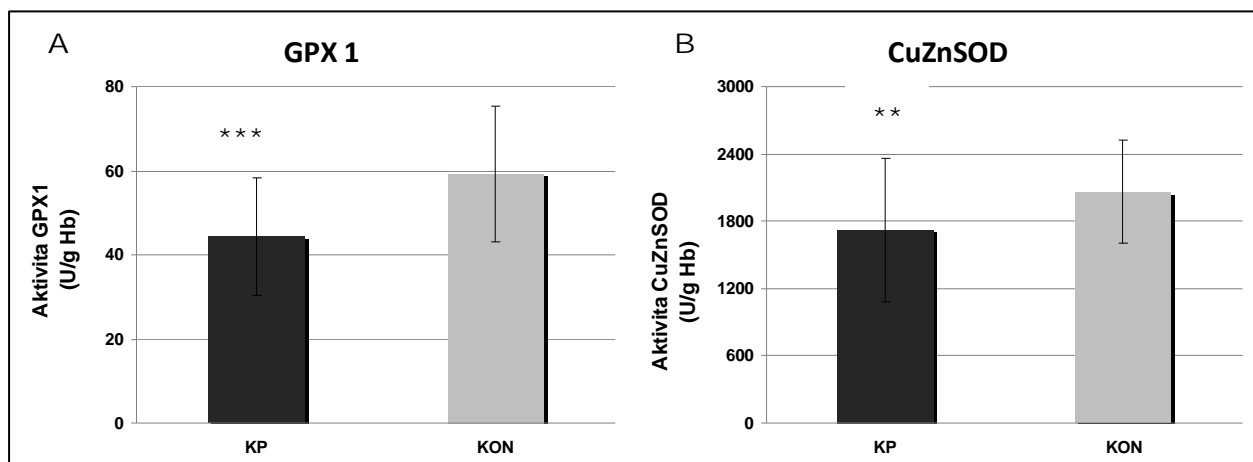
Základní klinické a biochemické parametry jsou uvedené v Tabulce 1. Do studie bylo zařazeno 64 pacientů s karcinomem pankreatu, jejichž hodnoty byly srovnávány s 64 zdravými osobami. Skupiny byly spárovány na základě věku a pohlaví. Mezi skupinami nebyly pozorovány signifikantní rozdíly ani v hodnotách BMI, celkového cholesterolu (TC) a LDL-C. Dle očekávání pacienti s KP měly signifikantně zvýšené hodnoty tumorových markerů.

Hlavními sledovanými parametry byly aktivity antioxidantních enzymů – CuZnSOD, CAT, GPX1, GR, PON1; spolu s markerem oxidačního stresu – konjugovanými dieny v precipitovaných LDL a koncentrací důležitého antioxidantu, redukovaného glutathionu (GSH). Nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl v aktivitách antioxidantních enzymů GR a CAT mezi pacienty s KP a kontrolami. Rozdíly v aktivitách GPX1 a CuZnSOD mezi skupinami jsou presentovány v grafu 1. Jak ukazuje tento graf, byly aktivity obou enzymů sniženy u pacientů s KP ve srovnání s kontrolami. Graf 2 demonstruje výsledky pro aktivitu PON1 spolu s HDL-C a apo A1 a výsledky pro koncentraci CD/LDL-C. Z tohoto grafu vyplývá, že pacienti s KP měli zvýšenou hladinu CD/LDL ve srovnání s KON. Pacienti s KP měli dále signifikantně snížené hodnoty koncentrace GSH ($p < 0,01$).

Tabulka 1: Základní charakteristika sledovaných skupin

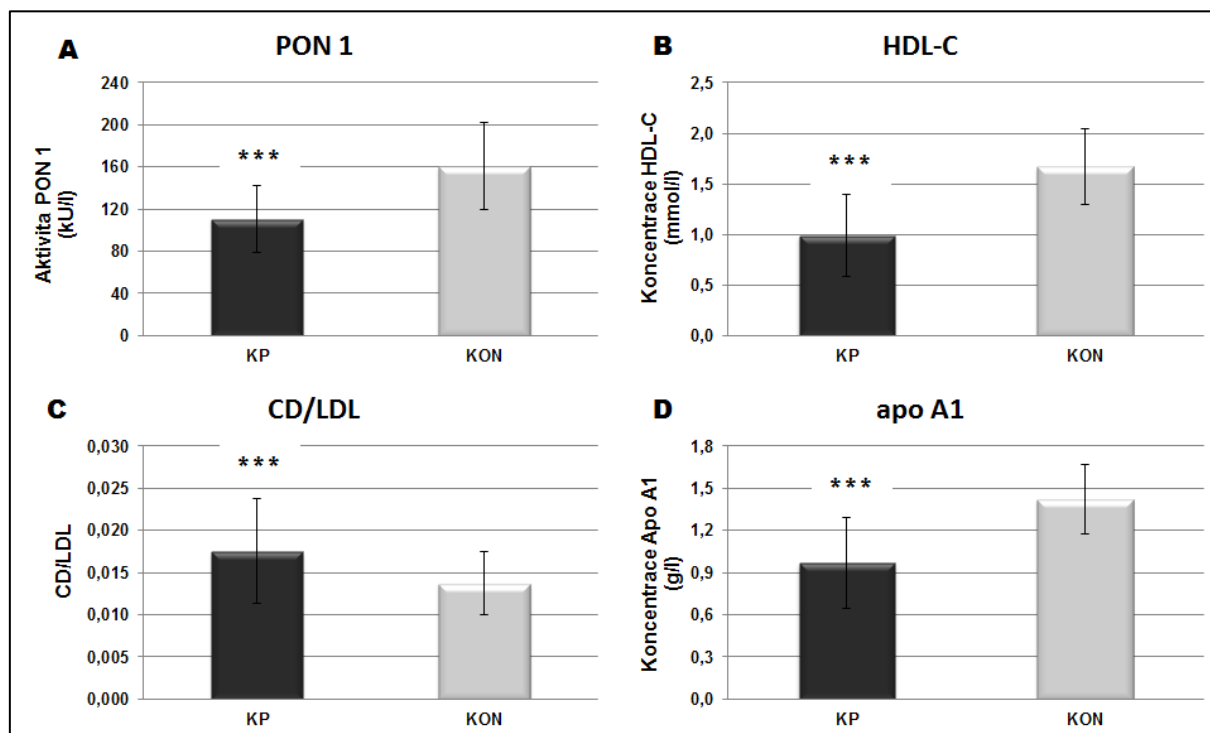
	Karcinom pankreatu	Kontrolní skupina	p
N	64	64	-
pohlaví (M/Ž)	29/35	29/35	-
věk (roky)	62,6 ± 9,7	59,7 ± 9,7	NS
BMI (kg/m ²)	24,7 ± 4,7	25,5 ± 3,8	NS
Glukosa (mmol/l)	7,4 ± 3,4	4,9 ± 0,50	< 0,001
CRP (mmol/l)	34,6 ± 45,0	4,4 ± 3,0	< 0,001
TC (mmol/l)	5,1 ± 1,6	5,5 ± 0,96	NS
TG (mmol/l)	1,76 ± 0,82	1,05 ± 0,35	< 0,001
LDL-C (mmol/l)	3,3 ± 1,5	3,4 ± 0,9	NS
Apo B (g/l)	1,14 ± 0,34	1,03 ± 0,24	< 0,05
CEA	23,9 ± 76,4	1,4 ± 1,4	< 0,001
CA 72-4	22,4 ± 55,5	5,0 ± 8,5	< 0,05
Bilirubin (μmol/l)	45,7 ± 60,8	12,1 ± 6,2	< 0,001
Kyselina močová (μmol/l)	250,0 ± 112,4	292,0 ± 77,6	< 0,05
Albumin	39,9 ± 6,7	47,3 ± 2,9	< 0,001

BMI: body mass index, TC: celkový cholesterol, TG: triglyceridy, LDL-C: low-density lipoprotein-cholesterol, CEA: karcinoembryonální antigen, CA 72-4: tumorový marker gastrointestinálního traktu, NS... nesignifikantní výsledky



Graf 1: Aktivita antioxidantních enzymů glutathionperoxidasy a superoxididismutasy

GPX1: glutathionperoxidasa, CuZnSOD: CuZn-superoxididismutasa, KP: pacienti s karcinomem pankreatu (n = 64), KON: kontrolní skupina (n = 64); * KP vs. KON, *** p < 0,001; ** p < 0,01.



Graf 2: Paraoxonasa 1 a konjugované dieny u pacientů s karcinomem pankreatu

PON1: paraoxonasa 1, HDL-C: high density lipoprotein, CD: konjugované dieny v precipitovaných LDL, apo A1: apolipoprotein A1, KP: pacienti s karcinomem pankreatu (n = 64), KON: kontrolní skupina (n = 64); * KP vs. KON, *** p < 0,001.

Diskuse

V naší studii zabývající se aktivitou antioxidantních enzymů, jsme u pacientů s KP zjistili snížené hodnoty aktivit GPX1, CuZnSOD a PON1 ve srovnání s KON. Taktéž koncentrace hlavního neenzymového antioxidantu GSH byla u pacientů s KP snižena ve srovnání s KON. U zbývajících dvou enzymů CAT a GR nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly mezi sledovanými skupinami. Hladina CD/LDL byla naopak signifikantně zvýšená u KP v porovnání s KON.

J. Cullen ve své studii prokázal sníženou expresi antioxidantních enzymů GPX1 a CuZnSOD u KP ve srovnání s KON (6). Tento výsledek je ve shodě s námi zjištěnými sníženými aktivitami těchto enzymů. Stejně tak jako v naší studii i studie Fukuiho et al. (7) neprokázala žádnou změnu v aktivitě CAT u pacientů s KP v porovnání s KON.

Tyto výsledky ukazují na porušenou oxidační rovnováhu u pacientů s KP, kde dochází k zvýšené produkci RONS a k nedostatečné funkci antioxidantního ochranného systému.

Literatura

1. Bardeesy N., DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 897-909.
2. Gutteridge JM., Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull* 1999; 55: 49-75.
3. Štípek S. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Praha: GRADA, 2000.
4. Kodydkova J., Vavrova L., Zeman M., et al. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clin Biochem* 2009; 42: 1368-1374.
5. Wieland H., Seidel D. A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1983; 24: 904-909.
6. Cullen JJ., Mitros FA., Oberley LW. Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreas* 2003; 26: 23-27.
7. Fukui M., Kanoh M., Takamatsu Y., Arakawa Y. Analysis of serum catalase activities in pancreatic diseases. *J Gastroenterol* 2004; 39: 469-474.

Poděkování

Podporováno grantem Ministerstva zdravotnictví ČR - NS 9769-4

ATHEROGENNÍ GENETICKÉ VARIANTY U MUŽŮ A ŽEN ČESKÉ POPULACE

ATHEROGENIC GENETIC VARIANTS THE CZECH POPULATION

M. Koudová¹, R. Vlčková¹, M. Bittóová¹, R. Alánová¹, I. Slepíčková¹, E. Lavická¹, M. Hlaváčová¹, G. Izrael¹, V. Indráková¹, M. Majer¹, J. Karas¹, E. Kohlíková^{1,2}

¹GHC Genetics s.r.o.- NZZ, ²FTVS UK, Praha

Úvod

Atherosklerosa je degenerativní proces v cévní stěně na podkladě chronického zánětu, který je důsledkem multifaktoriálního působení faktorů endogenních a faktorů zevního prostředí. Tyto rizikové faktory u každého jednotlivce působí v různé intenzitě, po různě dlouhou dobu a ne nutně všechny. Rizikové faktory zevního prostředí zahrnují kouření, nedostatečnou fyzickou aktivitu, stravu s vysokým příjmem tuků a infekce (Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori). Endogenní rizikové faktory, často se silnou genetickou komponentou, zahrnují mužské pohlaví, hypercholesterolémii (přesněji zvýšení frakce malých denzních LDL), hyperhomocysteinémii, hypertenzi, trombofilii, obezitu, inzulinovou rezistenci/diabetes mellitus a chronický zánět. Z tohoto důvodu genetické dispozice spojené s rizikem nebo protektivitou vzhledem k rozvoji aterosklerózy tvoří právě genetické varianty v genech, jejichž produkty zasahují a regulují rozvoj výše uvedených endogenních faktorů.

Metodika

V rámci pilotních projektů preventivní péče bylo celkem vyšetřeno 800 mužů a 800 žen české populace (po vyřazení pokrevních příbuzných bylo statisticky hodnoceno 776 mužů/781 žen), průměrný věk testovaných osob byl 39,9 let. Materiál pro izolaci DNA byl získán stěrem sliznice dutiny ústní odběrovou soupravou pro bukální stěr (Flocked Swabs) nebo odběrem periferní nesrážlivé žilní krve. DNA byla izolována použitím separačních kolonek Qiagen pomocí kitu QIAmp DNA Minikit dle modifikovaného protokolu a využitím přístroje pro semiautomatickou izolaci DNA QuickGene 810. Izolovaná DNA byla analyzována použitím následujících metod pro molekulárně genetickou analýzu: PCR-ARMS, Real-Time PCR, fragmentační analýza na genetickém analyzátoru ABI 3130, High Resolution Melting Analysis na přístroji LightScanner a metodou DNA Microarray (GoldenGate Genotyping Assay) na přístroji BeadStation 500G. Celkem bylo vyšetřeno 43 genetických variant (samostatně nebo v haplotypu) v genech: *APOE*, *APOB*, *APOC2*, *APOC3*, *LPL*, *CETP*, *ABCA1*, *MMP3*, *GJA4*, *SELP*, *PDE4D*, *F5*, *F2*, *F7*, *MTHFR*, *PAI-1*, *ITGB3* (*HPA1*), *FGG*, *AGT*, *AGTR1*, *ACE*, *ADRA2A*, *ADRB1*, *CYP11B2*, *NOS3*, *TNF α* , *PPAR γ* , *IL-6* a *IL-10*. Statisticky byly vyhodnoceny frekvence jednotlivých alel/genotypů/haplotypů, které byly srovnány s údaji evropské populace. Současně byly výsledky korelovány s anamnestickými údaji z osobní a rodinné anamnézy.

Výsledky

Frekvence alel *APOE* přibližně korelovala s údaji evropské populace - alela ApoE4 byla prokázána v 11,4 % u mužů a v 12,8 % u žen, alela ApoE2 v 7,6 % u mužů a v 8,8 % u žen. Signifikantní odlišnost oproti evropské populaci byla u mužů i žen v nižší frekvenci haplotypu ApoE4/E4, u mužů ve vyšším výskytu haplotypu ApoE2/E3 a u žen ve vyšším výskytu haplotypu ApoE2/E2. Závažné trombofilní mutace (mutace Leiden genu *F5* a mutace G20210A *F2*) byly celkem prokázány v 11,2 %. V genu *MTHFR* byl genotyp 677TT zvyšující hladinu homocysteinu prokázán v 10,5 %, trojkombinace rizikových alel 677T a 1298C (genotypy TT/AC a CT/CC) prokázána každá v 0,13 %, ale rizikový genotyp TT/CC

nalezen nebyl, což odpovídá dřívějším údajům, že zvyšující se podíl mutovaných alel 677T a 1298C *MTHFR* snižuje životaschopnost plodu. Genotypy asociované s vyšším rizikem rozvoje kardiovaskulárních chorob (infarktu myokardu a cévní mozkové příhody) 4G/4G genu *PAI-1* prokázán v 28,2 % a 1b/1b *HPAI* v 1,8 %. Frekvence dalších testovaných alel/genotypů odpovídala evropské populaci, signifikantní rozdíl byl ve vyšším výskytu alely Tag1B *CETP* asociované s hladinou HDL-cholesterolu, a to především u žen. Anamnesticky byly u testovaných jedinců zjištěny již v současnosti přítomné další rizikové faktory pro rozvoj aterosklerosy- hypertenze, kouření, zvýšená hladina cholesterolu/krevních tuků a především nadváha (téměř 50 % mužů a 40 % žen) a obezita I.-III. stupně (v 12 % u mužů i žen), přičemž až u 2/3 mužů měla největší podíl nedostatečná pohybová aktivita.

Závěr

Přínosem projektu je zjištění frekvence výskytu jednotlivých testovaných alel/genotypů/haplotypů asociovaných dle klinických studií s rozvojem aterosklerosy a kardiovaskulárních chorob v české populaci, tedy získání kontrolní skupiny pro další studie (např. korelace populace vs. pacienti, korelace česká populace vs. evropská populace), což umožní zpřesnění aplikace výsledků studií pro genetickou analýzu aterosklerosy. Dalším přínosem jsou samotné výsledky genetické analýzy pro každého testovaného jedince, neboť u predisponovaných osob včasným zavedením vhodné dispenzarizace a preventivních opatření předpokládáme snížení rizika a zpomalení nástupu aterosklerotických změn nebo jejich včasný záchyt a léčbu, což umožní prevenci rozvoje komplikací.

PODÍL PROTEINOVÉ ČÁSTI LDL NA VZNIKU OXIDOVANÉ FORMY ČÁSTICE LDL

THE PARTICIPATION OF PROTEIN SECTION OF LDL ON THE ORIGIN OF OXIDATIVE FORM OF LDL PARTICLE.

M. Votruba

MI-Vo-La consulting, Praha

Oxidované částice LDL jsou prvním předstupněm vzniku tak zvaných malých částic LDL. Tyto modifikované částice hrají zásadní roli při rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. Obvykle se klinická biochemie zabývá pouze otázkou jak se LDL částice oxiduje a kde dochází k oxidaci. Z tohoto úhlu pohledu je výzkum cílen na lipidovou část LDL, která vskutku odpovídá za zhroucení struktury fyziologické korpuskule LDL a tím dává podnět ke vzniku malých LDL. Ovšem v poslední době se orientace zájmu přesunuje také k apolipoproteinové složce. Ta byla zatím zkoumána hlavně s ohledem na význam zastoupení ApoB a ApoA v částici LDL a na diagnostický význam jejich vzájemného poměru, a to nejen až v LDL, ale už v částici VLDL. Jestliže je nyní prokázáno, že k oxidaci LDL dochází především v tělesných tekutinách, a to nejen v plasmě a lymfě, ale také např. ve slinách a následně také ve stěně cév, vzniká oprávněná otázka, jaký to má další vliv na rozvoj aterosklerózy. Z chemické podstaty složení bílkovin bylo postupně prokázáno, že oxidaci nejrůznějšími druhy volných radikálů podléhají: strukturální aminokyseliny a koncové skupiny COOH- karbonylace. Z aminokyselin se oxidace týká zejména: Tyrosinu, Tryptofanu, Fenylalaninu, Prolinu a Lysinu. Kromě toho se oxidací zvyšuje koncentrace sulfoxidů v Methioninu. Dalším druhem modifikace ox-LDL je glykace. Od doby objevu této reakce v plasmě, se nepodařilo prokázat vzájemný vztah oxidace a glykace. Převažuje tvrzení, že oxidace předchází glykaci, nebo že se jedná o zpřaženou reakci v prostředí vysoké koncentrace glukózy. Každopádně jde vždy o malé LDL částice. Glykace se týká zejména hlavního apoproteinu LDL - ApoB. Nejnovější výzkum se soustřeďuje na další modifikace LDL. Touto modifikací jsou tzv. minus-LDL. Dosah jejich působení je velmi široký, zasahuje dokonce do genetických procesů, ale není dostatečně probádaný. Do tohoto sdělení se tato anomálie dostala z toho důvodu, že jde zřejmě o převažující vliv bílkovinné části, protože bílkoviny jsou nositeli záporného náboje na rozdíl od neutrálních triacylglycerolů a kladně nabitých fosfolipidů. Mínavé LDL se ovšem týkají také fyziologických LDL, i když jejich výskyt je vázán na různá onemocnění. Závěrem lze říci, že výzkum následků oxidace apolipoproteinů je na prahu otevřených dveří a na konkrétní interpretaci si musíme ještě počkat.

VÍCENENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY N-3 ŘADY A DEPRESE**M. Zeman¹, R. Jiráček², M. Vecka¹, A. Žák¹**¹ IV. interní klinika I. LF UK a VFN Praha, ² Psychiatrická klinika I. LF UK a VFN Praha

Depresivní poruchy patří v České republice, podobně jako i v celém světě k nejvýznamnějším onemocněním z hlediska zdravotní a sociální zátěže společnosti. Podle Světová zdravotnické budou depresivní poruchy v roce 2020 po kardiovaskulárních onemocněních druhou nejčastější příčinou zneschopňujících zdravotních problémů. Ukázalo se, že značná část nemocných v ambulancích praktických lékařů trpí afektivními nebo úzkostnými poruchami, přičemž jen asi čtvrtina duševních poruch je léčebně ovlivňována (Anders a Skopová 2006). Deprese je přitom spojena se zvýšeným výskytem nejzávažnějších onemocnění, jako jsou diabetes mellitus nádory, kardiovaskulární onemocnění a některé nádory (Mezuk 2008, Katon 2009, Gross 2010, Serrano Jr. 2011, Whang 2009)

U všech těchto onemocnění hraje roli výživa, mezi jinými složení požívaného tuku (Micha a Mozaffarian 2010, Murthy 2009, Risérus 2009). Ve složení diety vyspělých společností došlo během minulých dvou století k výraznému vzestupu spotřeby celkových kalorií a nasycených tuků. Současně klesla spotřeba ovoce, zeleniny a vícenenasycených mastných kyselin (PUFA) řady n-3. Obsah PUFA n-6 naopak vzrostl, takže se výrazně změnil poměr n-6 ku n-3 řadě nenasyčených mastných kyselin ve prospěch n-6 řady (Simopoulos 1999). Předpokládá se, že PUFA n-3 hrají důležitou roli také v patogeneze některých neuropsychiatrických onemocnění, jako depresivní poruchy, schizofrenie či Alzheimerovy demence. PUFA n-3, zejména jejich hlavní představitelé: kyseliny eikosapentaenová (20:5 n-3, EPA) a dokosahexaenová (22:6 n-3, DHA) hrají významnou roli ve vývoji centrálního nervového systému (CNS) (Das 2003). V populacích, konzumujících méně ryb, jejichž tuk je významným zdrojem PUFA n-3 je vyšší výskyt deprese (Hibbeln 1998, Hibbeln 2002). U depresivních osob byly nalezeny snížené hladiny PUFA n-3 ve fosfolipidech různých tělesných tkání (erytrocyty, sérum, tuková tkáň, mozek) (Peet 1998, Edwards 1998, Maes 1999, Mamalakis 2002). Současně s poklesem PUFA n-3 jsou často nalézány zvýšené hodnoty poměru AA/EPA, AA/DHA, či poměru n-6/ n-3 mastných kyselin. V různých populacích jsou zjišťovány negativní korelace mezi hladinou PUFA n-3 a depresivní symptomatologií (Conklin 2007, Tiemeier 2003; Mamalakis 2006). Vícenenasycené mastné kyseliny řady omega-6 a omega-3 (PUFA n-6 a PUFA n-3) jsou v lidském organismu součástí biologických membrán, ovlivňují jejich fluiditu, interakci mezi lipidovými a proteinovými složkami, a modulují funkce různých enzymů, transportérů a receptorů, jsou strukturálními součástmi druhých posílů (*second messengers*), ovlivňují transkripci řady genů (Stubbs 1984). Oxidací dvacetihlíkatých PUFA n-6 i PUFA n-3 vznikají eikosanoidy (Fitzpatrick a Soberman 2001), které mají řadu významných biologických účinků. Oxidace kyseliny dokosahexaenové dává vzniknout dokosanoidům, chránícím neurony před oxidačním stresem a tlumícím apoptózu. Asi 50 – 60 % sušiny mozku dospělého člověka tvoří lipidy. Z toho asi 35 % tvoří mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, zejména kyselina arachidonová (AA, 20:4 n-6) a dokosahexaenová (DHA, 22:6 n-3) (McNamara a Carlson 2006). Podávání PUFA n-3 bylo zkoušeno v léčebném ovlivnění psychiatrických onemocnění, zejména u depresivní poruchy, bipolární deprese a poporodní deprese, buď samostatně nebo jako přídatek ke standardní léčbě. V řadě randomizovaných kontrolovaných studií byly získány příznivé výsledky (Peet a Horrobin 1998, Nemets 1998, Su 2003), v některých studiích však ke statisticky významnému efektu nedošlo (Marangell 2003, Silvers 2005). Nedávno byla publikována nová metaanalýza těchto studií (Appleton 2010), která hypotézu o příznivém terapeutickém efektu podporuje, ale současně bylo uzavřeno, že je obtížné tyto výsledky sumarizovat a úplně zhodnotit vzhledem

ke značné heterogenitě. Lepší efekt PUFA n-3 byl zjištěn u osob s těžší depresivní symptomatologií, zatímco u osob bez diagnostikovaného depresivního onemocnění byl účinek na náladu menší. V heterogenitě výsledků hraje zřejmě roli řada faktorů, např. různý obsah PUFA n-3 i n-6 řady ve stravě, složení placebo, rozdíl ve věku a mezi pohlavími, v průvodné léčbě, v trvání studie, dávce i typu použité PUFA n-3, nebo způsob hodnocení deprese (Appleton 2010).

Literatura

1. Anders M., Skopová J. Praktické otázky diagnostiky a léčby depresivních poruch. Praha, Galén 2006.
2. Appleton KM, Rogers PJ, Ness AR. Updated systematic review and meta-analysis of the effects of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on depressed mood. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 757–70.
3. Bazan NG. Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10(2): 136-141.
4. Conklin SM., Manuck SB., Yao JK., et al. High omega-6 and low omega-3 fatty acids are associated with depressive symptoms and neuroticism. *Psychosom Med* 2007; 9: 932-934.
5. Das UN. Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of the brain and memory. *Nutrition* 2003; 19: 62–65.
6. Edwards R., Peet M., Shay J., Horrobin D. Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. *J Affect Disord* 1998; 48: 149–155.
7. Gross AL., Gallo JJ., William W., Eaton WW. Depression and cancer risk: 24 years of follow-up of the Baltimore Epidemiologic Catchment Area sample. *Cancer Causes Control* 2010; 21(2): 191–199.
8. Katon W., Russo J., Lin EHB., et al. Depression and Diabetes: Factors Associated with Major Depression at 5-Year Follow-Up. *Psychosomatics* 2009; 50: 570-579
9. Larsson SC., Kumlin M., Ingelman-Sundberg M., Wolk A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 935-945.
10. Maes M., Christophe A., Delanghe J., et al. Lowered ω 3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients. *Psychiatry Res.* 1999;85:275–291.
11. Mamalakis G., Kalogeropoulos N., Andrikopoulos N., et al. Depression and long chain n-3 fatty acids in adipose tissue in adults from Crete. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60: 882-888.
12. Mamalakis G., Tornaritis M., Kafatos A. Depression and adipose essential polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 67(5): 311-318.
13. Marangell LB., Martinez JM., Zboyan HA., et al. A double-blind, placebo-controlled study of the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in the treatment of major depression. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 996–998.
14. McNamara RK., Carlson SE. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 75(4-5): 329-349.
15. Mezuk B., Eaton WW, Albrecht S, Golden SH. Depression and Type 2 Diabetes Over the Lifespan: A meta-analysis. *Diabetes Care* 2008; 31: 2383–2390.
16. Micha R., Mozaffarian D. Saturated Fat and Cardiometabolic Risk Factors, Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes: a Fresh Look at the Evidence. *Lipids* 2010; 45: 893–905.

17. Mozaffarian D., Micha R., Wallace S. Effects on Coronary Heart Disease of Increasing Polyunsaturated Fat in Place of Saturated Fat: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS Med* 2010; 7(3): e1000252.
18. Murthy NS., Mukherjee S., Ray G., Ray A. Dietary factors and cancer chemoprevention: An overview of obesity-related malignancies. *J Postgrad Med* 2009; 55: 45-54.
19. Nemets B., Stahl Z., Belmaker RH. Addition of omega-3 fatty acid to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 477-479.
20. Peet M., Horrobin DF. A dose-ranging study of the effects of ethyl-eicosapentaenoate in patients with ongoing depression despite apparently adequate treatment with standard drugs. *Arch Gen Psychiatry* 2002; 59: 913-919.
21. Peet M., Murphy B., Shay J., Horrobin D. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biol Psychiatry* 1998; 43: 315-319.
22. Risérus U., Willett WC., Hu FB. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res* 2009; 48: 44-51.
23. Serrano Jr CV., Setani KT., Sakamoto E., et al. Association between depression and development of coronary artery disease: pathophysiologic and diagnostic implications *Vasc Health Risk Manag* 2011; 7: 159-164.
24. Silvers KM., Woolley CC., Hamilton FC., et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of fish oil in the treatment of depression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 72: 211-218.
25. Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999; 70(3Suppl): 560S-569S.
26. Su K-P., Huang S-Y., Chiu C-C., Shen WW. Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003; 13: 267-271.
27. Tiemeier H., van Tuijl HR., Hofman A., et al. Plasma fatty acid composition and depression are associated in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 40-46.
28. Whang W., Kubzansky LD., Kawachi I., et al. Depression and Risk of Sudden Cardiac Death and Coronary Heart Disease in Women: Results from the Nurses' Health Study *J Am Coll Cardiol* 2009; 53(11): 950-958.

Podpořeno výzkumným záměrem MŠMT ČR, MSM 0021620820

POKYNY PRO ÚČINNOU PREVENCI KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ U ŽEN, AKTUALIZACE V ROCE 2011

Zdroj:

Effectiveness-Based Guidelines for the Prevention of Cardiovascular Disease in Women 2011 Update:

A Guideline from the American Heart Association

Lori Mosca, Emelia J. Benjamin, Kathy Berra, Judy L. Bezanson, Rowena J. Dolor, Donald M. Lloyd-Jones, L. Kristin Newby, Ileana L. Piña, Véronique L. Roger, Leslee J. Shaw, Dong Zhao, Theresa M. Beckie, Cheryl Bushnell, Jeanine D'Armiento, Penny M. Kris-Etherton, Jing Fang, Theodore G. Ganiats, Antoinette S. Gomes, Clarisa R. Gracia, Constance K. Haan, Elizabeth A. Jackson, Debra R. Judelson, Ellie Kelepouris, Carl J. Lavie, Anne Moore, Nancy A. Nussmeier, Elizabeth Ofili, Suzanne Oparil, Pamela Ouyang, Vivian W. Pinn, Katherine Sherif, Sidney C. Smith, Jr, Geogre Sopko, Nisha Chandra-Strobos, Elaine M. Urbina, Viola Vaccarino and Nanette K. Wenger.

Circulation 2011;123:1243-1262; originally published online Feb 14, 2011;

DOI: 10.1161/CIR.0b013e31820faaf8

Circulation is published by the American Heart Association.

7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2011 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7322.

Online ISSN: 1524-4539

Being distributed by the Research Center for Stroke & Heart Disease of the Jacobs Neurological Institute, State University of New York at Buffalo as part of the *Primary Care Partnerships to Prevent Heart Disease in Women* program.

Překlad MUDr. Magdalena Lejsková, Ph.D.

Nejčastější příčina smrti žen

Kardiovaskulární choroby jsou nejčastější příčinou úmrtí žen na světě. Ve Spojených státech zemře každý rok na tyto choroby více žen než mužů. Tato skutečnost dosud není mezi lékaři obecně známá. Prezentovaná aktualizace pokynů pro primární prevenci kardiovaskulárních chorob u žen z roku 2011 poskytuje nejaktuálnější klinická doporučení pro prevenci kardiovaskulárních onemocnění u žen nad 20 let věku. Pokyny byly vypracovány špičkovými odborníky podle systematicky vyhledávaných nejnovějších poznatků.

Klasifikace kardiovaskulárního rizika u žen

Vysoké riziko (aspoň 1 faktor odpovídá níže uvedeným stavům vysokého rizika):

- Klinicky manifestní ICHS
- Klinicky manifestní cerebrovaskulární onemocnění
- Klinicky manifestní ischemická choroba dolních končetin
- Aneurysma břišní aorty
- Selhání ledvin (ESRD) nebo závažné chronické onemocnění ledvin
- Diabetes mellitus
- Predikované desetileté kardiovaskulární riziko vyšší než 10%

Zvýšené riziko (aspoň 1 hlavní rizikový faktor):

- Kuřáctví cigaret
- STK > 120 mmHg, DTK > 80 mmHg, nebo ošetřené hypertenze
- Celkový cholesterol > 5,2 mmol/L, HDL-C < 1,3 mmol/L, nebo léčená dyslipidemie
- Obezita, zejména centrální obezita
- Nevhodná skladba stravy
- Fyzická inaktivita
- Rodinná anamnéza předčasných CVD vyskytující se u příbuzných 1. stupně u mužů mladších 55 let věku nebo u žen mladších 65 let věku
- Metabolický syndrom
- Preklinické známky pokročilé aterosklerózy (např. koronární kalcifikace, aterosklerotické pláty nebo zesílená IMT karotid)
- Snížená výkonnost při testu (např. na běžecím pásu) a / nebo abnormální srdeční frekvence po ukončení zátěže
- Systémová autoimunitní onemocnění pojiva i cév (např. systémový lupus erythematosus nebo revmatoidní artritida)
- Anamnéza preeklampsie, gestačního diabetu nebo těhotenstvím navozené hypertenze

Ideální kardiovaskulární zdraví (splněny všechny uvedené podmínky):

- Celkový cholesterol < 5,2 mmol/L (bez léčby)
- TK < 120 / < 80 mm Hg (bez léčby)
- Glykemie nalačno < 5,6 mmol/L (bez léčby)
- Body mass index < 25 mg/m²
- Nekuřáctví
- Fyzická aktivita u dospělých starších 20 let: > 150 min týdně střední intenzity nebo > 75 min vysoké intenzity týdně nebo kombinace
- Zdravá dieta (DASH-like - viz Appendix)

Ideální kardiovaskulární zdraví (splněny všechny uvedené podmínky):

- Celkový cholesterol < 5,2 mmol/L (bez léčby)
- TK < 120 / < 80 mm Hg (bez léčby)
- Glykemie nalačno < 5,6 mmol/L (bez léčby)
- Body mass index < 25 mg/m²
- Nekuřáctví
- Fyzická aktivita u dospělých starších 20 let: > 150 min týdně střední intenzity nebo > 75 min vysoké intenzity týdně nebo kombinace
- Zdravá dieta (DASH-like - viz Appendix)

Klasifikace a úroveň důkazů (síla doporučení)**Klasifikace důkazu**

- Třída I: Intervence je užitečná a efektivní
- Třída IIa: Síla důkazu/názory jsou silně ve prospěch užitečnosti/účinnosti
- Třída IIb: Užitečnost/účinnost je méně dobře podložena důkazy/názory
- Třída III: Postup/test není přínosný, nemá žádné prokázané výhody
- Postup/test přináší nadměrné náklady bez prospěchu nebo je léčba škodlivá pro pacienty

Úroveň důkazů

- A Dostatečné důkazy z většího počtu randomizovaných studií
- B Omezené důkazy z jedné randomizované studie nebo dalších nerandomizovaných studií
- C Důkaz založen na znaleckém posudku, kasuistice nebo standardní péči

Pokyny pro prevenci kardiovaskulárních chorob u žen:

1. Změny životního stylu

Kouření cigaret

Ženy je třeba upozornit, aby přestaly kouřit a vyhýbaly se i tabákovému kouři v prostředí. K nekuřáctví má být poskytnuto poradenství, behaviorální a náhradní nikotinová léčba event. další farmakoterapie, podle programů na odvykání kouření (třída I, úroveň důkazu B).

Fyzická aktivita

Ženám by měla být doporučena fyzická aktivita: týdně nejméně 150 minut mírné nebo 75 minut intenzivní aerobní fyzické aktivity, popř. odpovídající kombinace obou. Aerobní aktivita je nejučinnější, pokud probíhá v epizodách trvajících aspoň 10 minut, a je pokud možno rozložena na celý týden (třída I, úroveň důkazu B).

Ženám by mělo být doporučeno i další prodloužení doby, které přináší prospěch: aerobní fyzická aktivita střední intenzity až na 5 h (300 min) týdně, popř. intenzivní aktivita na 2,5h týdně nebo odpovídající kombinace obou (třída I, úroveň důkazu B).

Ženám, které potřebují zhubnout a udržet váhový úbytek, by mělo být doporučeno dosáhnout minimálně 60 až 90 minut alespoň středně intenzivní fyzické aktivity (např. rychlá chůze), po většinu dnů v týdnu, nejlépe denně (třída I, úroveň důkazu B).

Kardiovaskulární rehabilitace

Ženám s recentní KV příhodou by měl být doporučen komplexní režim na snížení kardiovaskulárního rizika, jako je rehabilitace kardiovaskulární nebo rehabilitace po iktu, popř. lékařem doporučené cvičení domácí nebo se skupinou. Tento postup je vhodný zejména u žen, které před nedávnem prodělaly akutní koronární syndrom nebo koronární revaskularizaci, nově vzniklou nebo chronickou anginu pectoris, recentní cévní mozkovou příhodu, onemocnění periferních arterií (třída I, úroveň důkazu A) nebo měly příznaky srdečního selhání a LVEG <35% (třída I, úroveň důkazu B).

Dietní příjem

Ženám má být doporučena konzumace stravy bohaté na ovoce a zeleninu, výběr celozrnných potravin vysokým obsahem vlákniny, konzumace ryb, zejména tučných ryb alespoň dvakrát týdně, omezení příjmu nasycených tuků, cholesterolu, alkoholu, sodíku a cukru, a vyhýbání se potravinám s trans-mastnými kyselinami. Viz příloha (třída I, úroveň důkazu B).

Poznámka: Těhotné ženy by měly být poučeny o potenciální škodlivosti ryb, které mají potenciál pro nejvyšší úroveň kontaminace rtuť (např. žralok, mečoun, královská makrela nebo štíhlce).

Udržování hmotnosti / snížení

Ženy by si měly hmotnost zachovat, nebo hubnout pomocí vhodného poměru fyzické aktivity, kalorického příjmu a behaviorálních programů, pokud je toho zapotřebí pro udržení/dosažení vhodné tělesné hmotnosti (např. BMI < 25 kg/m²), obvodu pasu (např. < 88 cm), nebo jiné cílové míry obezity (třída I, úroveň důkazu B).

Omega-3 mastné kyseliny

U žen s hypercholesterolémií a/nebo hypertriglyceridémií může být konzumace omega-3 mastných kyselin ve formě ryb nebo ve formě kapslí (např. EPA 1,8 g/den) považována za vhodnou pro primární i sekundární prevenci (třída IIb, úroveň důkazu B). Poznámka: V rybím oleji jako doplňku stravy může být velmi různé množství EPA a DHA (zřejmě jediné účinné látky).

2. Hlavní intervence rizikových faktorů

Krevní tlak: optimální úroveň a životní styl

Dosažení optimálního krevního tlaku < 120/80 mmHg by mělo být podporováno různými přístupy v životním stylu, jako je udržení tělesné hmotnosti, zvýšení fyzické aktivity, střídavá konzumace alkoholu, omezení sodíku a zvýšená konzumace čerstvého ovoce, zeleniny a nízkotučných mléčných výrobků (třída I, úroveň důkazu B).

Krevní tlak: farmakoterapie

Farmakoterapie hypertenze je indikována, když je krevní tlak >140/90 mmHg (>130/80 mmHg při diagnóze chronického onemocnění ledvin a diabetes mellitus). Thiazidová diuretika mohou být součástí lékového režimu u většiny pacientů, pokud nejsou kontraindikována nebo pokud nejsou přednostní indikace pro jiné lékové skupiny u specifických chorob. Počáteční léčba u vysoce rizikových žen s akutním koronárním syndromem nebo MI by měla zahrnovat β -blokátory a/nebo ACE inhibitory/ARB; s přidáním dalších léků, např. thiazidových diuretik, tam, kde je potřebný další typ antihypertenziv k dosažení cílového krevního tlaku (třída I, úroveň důkazu A).

Poznámka: ACE inhibitory jsou kontraindikovány v těhotenství a měly by být používány s opatrností u žen, které mohou otěhotnět.

Lipidy a lipoproteiny v plazmě: optimální hladiny a životní styl

Dosažení následujících hladin lipidů a lipoproteinů u žen by mělo být podporováno přístupy životního stylu: LDL-C < 2,6 mmol/l, HDL-C > 1,3 mmol/L, triglyceridy < 1,7 mmol/L, a non-HDL-C (celkový cholesterol minus HDL-C), < 3,4 mmol/L (třída I, úroveň důkazu B).

Lipidy: farmakoterapie pro snížení LDL-C u vysoce rizikových žen

Farmakoterapie snižující LDL-C je doporučována současně s vhodným životním stylem u žen s ICHS – cílem je dosáhnout LDL-C < 2,6 mmol/L (třída I, úroveň důkazu A) a je také indikována u žen s jinými aterosklerotickými KVO nebo diabetes mellitus nebo desetiletým absolutním rizikem nad 20% (třída I, úroveň důkazu B).

Snížení LDL-C pod 1,8 mmol/L je vhodné u velmi-vysoce rizikových žen (very-high-risk) s ICHS (např. u pacientek s nedávno prodělaným ACS nebo s více nedostatečně kompenzovanými kardiovaskulárními rizikovými faktory) a může vyžadovat lékovou kombinaci zaměřenou na snížení LDL (třída IIa, úroveň důkazu B).

Lipidy: farmakoterapie pro snížení LDL-C u dalších rizikových žen

Farmakoterapie snižující LDL-C je vhodná, pokud je LDL-C nad 3,4 mmol/L, je přítomno více rizikových faktorů a desetileté absolutní riziko ICHS je mezi 10%-20% (třída I, úroveň důkazu B).

Terapie snižující LDL-C pouze vhodným životním stylem je indikována při LDL-C nad 4,1 mmol/L s dalšími rizikovými faktory, pouze tam, kde desetileté absolutní riziko nedosahuje 10% (třída I, úroveň důkazu B).

Léčba vhodným životním stylem ke snížení LDL-C je užitečná, pokud je LDL vyšší než 4,9 mmol/L, a to bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost dalších rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění (třída I, úroveň důkazu B).

U žen starších šedesáti let s odhadem desetiletého rizika ICHS nad 10%, měla by být zvážena léčba statiny, pokud je hsCRP vyšší než 2 mg/L – po vhodné změně životního stylu a vyloučení akutního zánětlivého procesu (třída IIb, úroveň důkazu B).

Lipidy: farmakoterapie pro nízkou hladinou HDL-C nebo zvýšený non-HDL-C

Léčba niacinem nebo fibráty může být využita, je-li u vysoce rizikových žen i po dosažení cíle pro LDL-cholesterol nízká hladina HDL-C (<1,3 mmol/L) nebo zvýšená hladina non-HDL-C (> 3,4 mmol/L) (třída IIb, úroveň důkazů B).

Diabetes mellitus

Životní styl a farmakoterapie diabetu by měla u žen s diabetem docílit HbA1C < 5,4 % (IFCC) - pokud je schůdné této kompenzace dosáhnout bez výrazné hypoglykemie (třída IIa, úroveň důkazu B).

3. Preventivní lékové intervence

Kyselina acetylsalicylová u žen s vysokým rizikem

Léčba kyselinou acetylsalicylovou (75 - 325 mg/den) by měla být zahájena u žen s ICHS, pokud není kontraindikována (třída I, úroveň důkazu A).

Léčba kyselinou acetylsalicylovou (75 - 325 mg/den) je vhodná u žen s diabetem mellitem, pokud není kontraindikována (třída IIa, úroveň důkazu B).

Pokud žena s vysokým rizikem netoleruje léčbu kyselinou acetylsalicylovou, měla by být nahrazena klopidogelem (třída I, úroveň důkazu B).

Kyselina acetylsalicylová u dalších žen rizikových nebo zdravých

Antiagregační léčba kyselinou acetylsalicylovou může být užitečná u žen starších 65 let (81 mg denně nebo 100 mg každý druhý den), je-li krevní tlak pod kontrolou, pak je pravděpodobné, že přínos pro prevenci ischemických cévních mozkových příhod a infarktu myokardu prevence převáží rizika gastrointestinálního krvácení a hemoragické cévní mozkové příhody (třída IIa, úroveň důkazu B). Tato léčba může být racionální i u žen mladších než 65 let pro prevenci ischemických cévních mozkových příhod (třída IIb, úroveň důkazu B).

Kyselina acetylsalicylová při fibrilaci síní

Kyselina acetylsalicylová 75-325 mg denně by měla být indikována u žen s chronickou nebo paroxysmální fibrilací síní, mají-li kontraindikaci k warfarinu nebo nízké riziko cévní mozkové příhody (< 1%/rok, nebo CHADS2 skóre < 2) (třída I, úroveň důkazu A).

Warfarin při fibrilaci síní

U žen s chronickou nebo paroxysmální fibrilací síní, by měl být warfarin indikován k udržení INR v rozmezí 2,0 - 3,0, mají-li nízké riziko cévní mozkové příhody (< 1%/rok, nebo vysoké riziko krvácení) (Třída I, úroveň důkazu A).

Dabigatran při fibrilaci síní

Dabigatran je vhodnou jako alternativou k warfarinu při prevenci iktu a systémové tromboembolie u pacientů s paroxysmální nebo chronickou fibrilací síní a rizikovými faktory pro iktus nebo systémovou embolizaci, kteří nemají protetické srdeční chlopně nebo hemodynamicky významné chlopně vady, těžkou poruchu ledvin (clearance kreatininu pod 0,25 mL/s), nebo pokročilé onemocnění jater (s bazální poruchou koagulace) (třída I, úroveň důkazu B).

β-blokátory

β-blokátory by měly být indikovány až na 12 měsíců (třída I, úroveň důkazu A), nebo až na 3 roky (třída I, úroveň důkazu B) u všech žen po infarktu myokardu nebo ACS s normální funkcí levé komory, pokud nejsou tyto léky kontraindikovány (třída I, úroveň důkazu A). β-blokátory s prodlouženým uvolňováním by měly být indikovány na dobu neurčitou u žen se selháním levé komory, pokud nejsou přítomny kontraindikace (třída I, úroveň důkazu A). Léčba β-blokátory s prodlouženým účinkem může být zvažována i u dalších žen s kardiovaskulárními chorobami a normální funkcí levé komory srdeční (třída IIb, úroveň důkazu C).

ACE inhibitory / ARB

Léčba ACE inhibitory by měla být zahájena (pokud není kontraindikována), u žen po infarktu myokardu a u žen s klinickými projevy srdečního selhání nebo LVEF <40%, nebo diabetes mellitus (třída I, úroveň důkazu A). U žen po infarktu myokardu i u žen s klinickými známkami srdečního selhání, s LVEF <40% nebo s diabetem mellitem, které netolerují ACE inhibitory, by měly být užívány sartany místo ACE inhibitorů (třída I, úroveň důkazu B). Poznámka: ACE inhibitory jsou kontraindikovány v těhotenství a měly by být užívány s opatrností u žen, které mohou otěhotnět.

Blokátory aldosteronu

Užití blokátorů aldosteronu (např. spironolactonu) po infarktu myokardu je indikováno u žen, které nemají významné hypotenze, poruchu funkce ledvin ani hyperkalémii, a které již užívají terapeutické dávky ACE inhibitorů a β-blokátorů a mají LVEF <40% se symptomatickým srdečním selháním (třída I, úroveň důkazu B).

Třída III intervencí pro prevenci CVD u žen (postupy, které nejsou užitečné/efektivní a mohou být i nebezpečné)

4. Třída III intervencí pro prevenci CVD a žen (postupy, které nejsou užitečné/efektivní a mohou být nebezpečné)

Menopauzální léčba

Hormonální terapie a selektivní estrogen receptor-modulátory (SERM) by neměly být užívány v primární nebo sekundární prevenci CVD (třída III, úroveň důkazu A).

Antioxidační suplementy

Doplňky stravy s antioxidačním účinkem (např. vitamin E, C a beta karoten) by neměly být užívány pro primární nebo sekundární prevenci CVD (třída III, úroveň důkazu A).

Kyselina listová

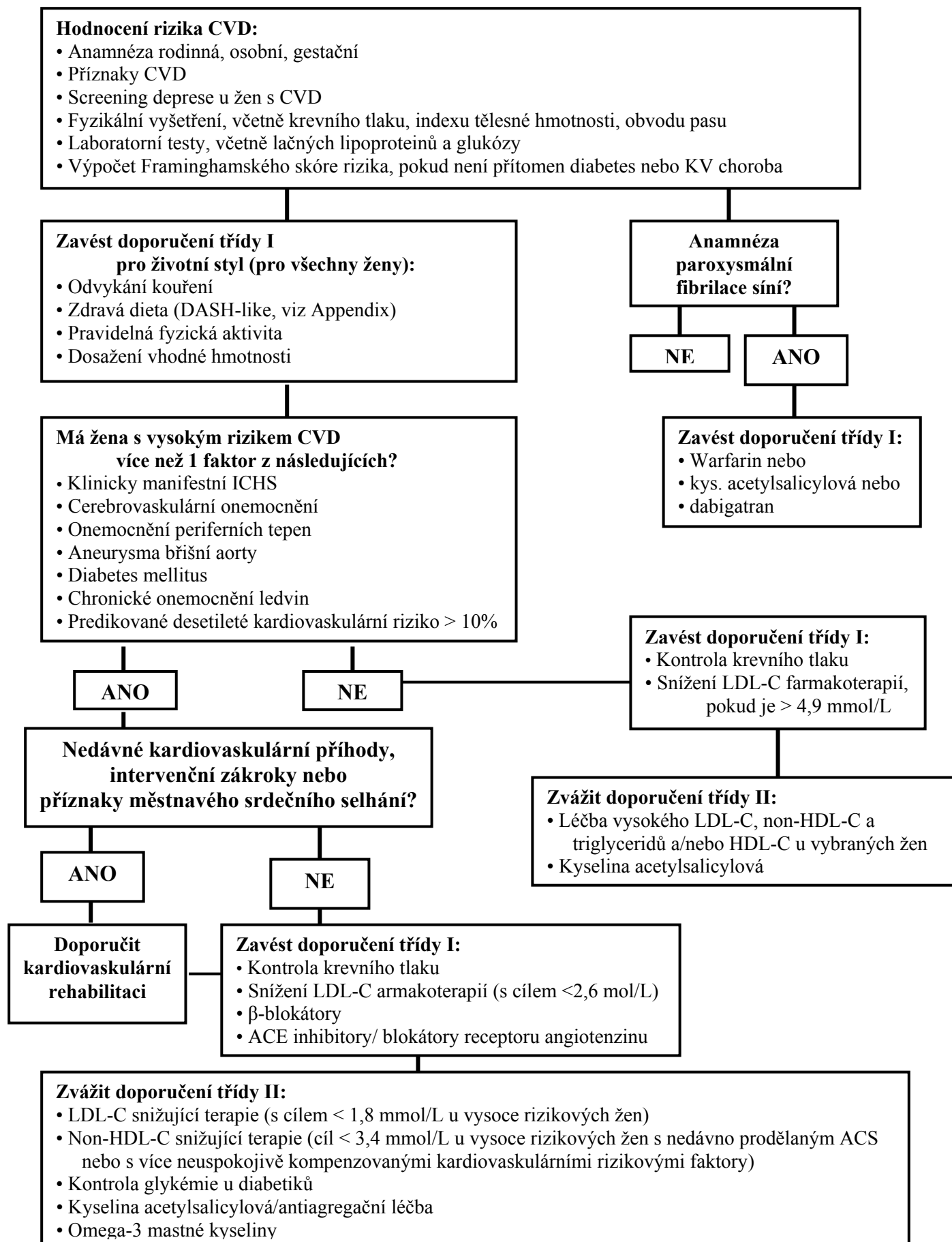
Kyselina listová, (s nebo bez suplementace vitamíny B6 a B12), by neměla být užívána pro primární nebo sekundární prevenci kardiovaskulárních onemocnění (třída III, úroveň důkazu A).

Poznámka: Suplementace kyselinou listovou ale může být doporučena v reprodukčním věku, aby se zabránilo vývojovým defektům nervové trubice plodu.

Kyselina acetylsalicylová pro primární prevenci MI u žen < 65 let

Rutiní užívání kyseliny acetylsalicylové u zdravých žen mladších než 65 let věku se nedoporučuje v primární prevenci MI (třída III, úroveň důkazu B).

Schema doporučené prevence kardiovaskulárních chorob u žen



Příloha. Konkrétní doporučení změn diety a životního stylu pro ženy

Faktor	Jednotka	Dávka
Ovoce a zelenina	> 4,5 šálků/den	1 šálek syrové listové zeleniny, 1/2 šálku nakrájené syrové nebo vařené zeleniny, 1/2 šálku šťávy ze zeleniny, 1 kousek ovoce střední velikosti, 1/4 šálku sušeného ovoce, 1/2 šálku čerstvého, zmrazeného nebo konzervovaného ovoce, 1/2 šálku ovocné šťávy
Ryby	2x týdně 100g	vařené, nejlépe tučné druhy ryb
Vláknina	30 g/den (1,1 g/10 g sacharidů)	celozrnné cereálie, ovoce, avokádo, apod.
Cereálie	3x denně	1 krajíc chleba, 30g suchých obilovin, 1/2 šálku vařené rýže, těstovin nebo obilovin (vesměs celozrnné produkty)
Cukr	< 5x týdně (< 450 kcal týdně z nápojů slazených cukrem)	1 čajová lžička cukru, 1 lžička želé nebo džemu, 1/2 šálku zmrzliny, 1 šálek limonády
Ořechy, luštěniny	> 4x týdně	1/3 šálku nebo 40g ořechů (vyhnout se soleným ořechům, 2 čajové lžičky arašídového másla, 2 čajové lžičky nebo 15g semínek, 1/2 šálku vařené luštěniny (fazole, hrách)
Nasycené tuky	< 7 % celkového energetického příjmu	Jsou přítomny ve smažených potravinách, tučném masu nebo kuřecí kůži, dezertech, máslu, sýrech, zakysané smetaně atd.
Cholesterol	< 150 mg denně	v živočišných tucích, vnitřnostech, vejcích atd.
Alkohol	max 1x denně	1dcl vína, 3dcl piva, 0,4dcl 40% likéru
Sodík	< 1,5 g denně	
Trans-mastné kyseliny		0

Poznámka: doporučené dávkování vychází z diety 2000 kcal/den, a doporučení mohou kolísat podle individuálních preferencí a potřeb.

Poznámka pro Vitamin D: Očekává se, že probíhající výzkum týkající se role vitamínu D v prevenci kardiovaskulárních onemocnění odhalí podrobněji význam ev. suplementace vitamínu D pro tyto choroby.

ACE, angiotensin-konvertující enzym; **ACS**, akutní koronární syndrom; **ARB**, blokátor receptoru angiotenzinu; **BMI**, body mass index; **TK**, krevní tlak; **CVD**, kardiovaskulární onemocnění; **DASH**, Dietary Approaches to Stop Hypertension; **DHA**, dokosaheptaenová kyselina; **DTK/STK**, diastolický/systolický krevní tlak; **EPA**, eikosapentaenová kyselina; **HbA1C**, hemoglobin A1c; **HDL-C**, cholesterolová frakce v lipoproteinech o vysoké hustotě; **hsCPR**, Highsensitivity C-reaktivního proteinu; **CHADS2**, Congestive Heart Failure, Hypertension, Age, Diabetes, Prior Stroke; **ICHS (CHD)**, ischemická choroba srdeční; **IMT**, tloušťka intimy-medie; **INR**, international normalized ratio; **LDL-C**, cholesterolová frakce v lipoproteinech o nízké hustotě; **LVEF**, ejekční frakce levé komory; **MI**, infarkt myokardu;

Práce byla podpořena grantem NS10511-3/2009 IGA MZCR

ADIPOCYTOKINY U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

J. Macášek, M. Zeman

4. interní klinika, 1.lékařská fakulta UK a VFN Praha

Úvod

Pojmem adipocytokiny označujeme soubor molekul produkovaných tukovou tkání, které mají řadu významných biologických účinků. Tuková tkáň tedy není pouze pasivní zásobárnou lipidů či tepelným izolátorem, ale je i velmi aktivní endokrinní tkání. Nahromadění tukové tkáně, zejména ve viscerální oblasti, je spojeno se zvýšeným rizikem rozvoje metabolického syndromu, aterosklerózy ale i onkologických onemocnění. V tomto směru je nežádoucí především centrální obezita, při které se tuková tkáň deponuje v břišní dutině (omentální, mezenteriální a retroperitoneální tuk- souhrně viscerální tuk). Obezita vede u predisponovaných jedinců k rozvoji inzulínové rezistence (IR). Na jejím rozvoji se patofyziologicky podílejí volné mastné kyseliny, které jsou transportovány k játrům prostřednictvím portální žíly z viscerální tukové tkáně, a adipocytokiny, kterých byla dodnes objevena celá řada. V současné době se též ukazuje, že adipocytokiny adiponektin a leptin se podílí na rozvoji mnoha patologických stavů. Adiponektin a leptin totiž hrají úlohu při vzniku maligních nádorů a mohou tak být pojítkem mezi nimi a obezitou, což je mimo jiné empiricky vyzorováno.

Adiponektin

Základní informace

Adiponektin byl identifikován v roce 1995 a je znám pod alternativními názvy jako acrp30 (adipocyte komplement related protein of 30 kDa), adipoQ (adipocyte C1Q and collagen domain-containing), apM1 (adipose most abundant gene transcript 1) či GBP28 (gelatin-binding protein 28). Adiponektin je protein složený z 244 aminokyselin o molekulové hmotnosti 30 kDa. Dříve se předpokládalo, že je syntetizován pouze v adipocytech, novější práce však popisují jeho syntézu též v osteoblastech, hepatocytech a kardiomyocytech. Tento fakt poukazuje na to, že může hrát důležitou roli v jejich metabolismu. Gen pro adiponektin je lokalizován na chromozomu 3q27, což je oblast, která je u bílé populace lokusem pravděpodobně se podílejícím na rozvoji metabolického syndromu či diabetu mellitu 2. typu. Na regulaci exprese adiponektinu se podílí větší množství působků. Interleukin 6, TNF- α , glukokortikoidy, katecholaminy či inzulín syntézu adiponektinu inhibují. Adiponektin zpětnovazebně též snižuje svoji expresi. Thiazolidindiony (aktivátory receptorů PPAR- γ), užívané jako perorální antidiabetika, jako jedny z mála látek zvyšují tvorbu HMW izoformy adiponektinu a podporují tudíž jeho inzulín senzitivizující účinky. Zvýšení exprese adiponektinu bylo popsáno také po podávání n-3 mastných kyselin u myši (Flachs et al.) Fyzická aktivita zvyšuje ve svalech nejen hladinu cirkulujícího adiponektinu, ale i obsah mRNA pro adiponektinové receptory. To by mohl být mechanismus účinku, kterým fyzická aktivita zlepšuje svalovou inzulínovou rezistenci. Strukturně je adiponektin tvořen třemi doménami: signální částí, fibrilárním N- koncovým úsekem, který se strukturálně podobný kolagenu VIII a X, a lobulárním C-koncovým úsekem. Molekula adiponektinu je jako celek strukturálně podobná též C1q součásti komplementu a cytokinu TNF-alfa, což může vysvětlovat jejich vzájemný antagonistický účinek. Plasmatické hladiny adiponektinu se pohybují mezi 3-30 $\mu\text{g/ml}$. Z celkového množství bílkovin tvoří 0,01 - 0,05 %, což je vyšší hodnota. Jeho plasmatické koncentrace jsou o 40 % vyšší u žen nezávisle na množství tukové tkáně a také u bělošské populace ve srovnání s indoasijskou populací. Postmenopauzální ženy

mají vyšší hladinu plasmatického adiponektinu než ženy premenopauzální. Za tyto rozdílné hodnoty je pravděpodobně zodpovědné působení pohlavních hormonů. Testosteron i estrogeny snižují hladinu u adiponektinu. V plasmě se adiponektin vyskytuje pouze v oligomerní formě. V krvi cirkulují dvě základní izoformy: LMW izoforma (lower molecular weight) a HMW izoforma (high molecular weight). LMW izoforma představuje trimetr a hexamer a HMW izoforma 12- až 18-mer. Studie prokázali, že pozitivní účinky adiponektinu jsou zprostředkovány především prostřednictvím jeho HMW formy, která se účastní i jeho intracelulárních pochodů. Osoby se zvýšenou hladinou HMW izoformy adiponektinu mají nižší incidenci diabetu mellitus 2. typu. Adiponektin se váže ke dvěma typům receptorů, označovaných jako AdipoR1 a AdipoR2 receptory.

Mechanismus účinku

Adiponektin svůj metabolický efekt uplatňuje prostřednictvím aktivace receptorů AdipoR (1 a 2) a adaptorového proteinu APPL1. Prostřednictvím receptoru AdipoR1 je aktivována především AMP-kináza. Po navázání adiponektinu na receptor AdipoR2 jsou stimulovány PPAR- α receptory. Stimulace AMP-kinázy prostřednictvím navázání adiponektinu na receptor AdipoR1 vede ke stimulaci oxidace mastných kyselin, inhibici glukoneogeneze a stimulaci vstupu glukosy do buňky zvýšením počtu GLUT-4 transporterů v membráně buňky s následným inzulín senzitivizujícím účinkem. Aktivace receptorů PPAR- α (přes AdipoR2) též zvyšuje oxidaci mastných kyselin, potlačuje oxidativní stres a působí antiinflatorně. Na snížení inzulínové rezistence se podílí nejenom zvýšené množství GLUT-4 transporterů v membránách svalových buněk, ale i snížení triacylglycerolémie zvýšeným katabolismem VLDL částic ve svalech.

Klinický význam

Role adiponektinu je zkoumána u obezity, u diabetu mellitus 2. typu, u aterosklerózy, či u onkologických onemocnění.

Hladina adiponektinu je snížena u pacientů trpících obezitou, metabolickým syndromem, diabetem mellitus 2. typu či aterosklerózou a jejími kardiovaskulárními komplikacemi. Tento jev je vysvětlován proinflatorním a prooxidačním stavem při těchto onemocněních a negativním účinkem cytokinů na produkci adiponektinu (viz parakrinní regulace syntézy adiponektinu). Hypoadiponektinémie hraje též úlohu v rozvoji arteriální hypertenze.

Zdá se, že adiponektin má významnou úlohu i v patogenezi nádorových onemocnění. Ukazuje se, že hladiny adiponektinu mají až na jednu výjimku inverzní vztah k riziku rozvoje nádorů, které jsou spjaty s obezitou a inzulínovou rezistencí. Mezi tyto nádory patří kolorektální karcinom, karcinom prsu, endometria, žaludku, prostaty či leukémie. U karcinomu pankreatu jsou nalézány naopak vyšší hodnoty adiponektinu. Mechanismy působení adiponektinu v rozvoji těchto nádorových onemocnění jsou nepřímé a přímé. Mezi nepřímé mechanismy řadíme například patofyziologický děj, který vychází z inverzního vztahu koncentrace adiponektinu a inzulínu. Nízká hladina adiponektinu vede k inzulínorezistenci, která způsobí hyperinzulinémii, nadbytek inzulínu snižuje množství insulin-like growth factor binding proteinu 1, což zvyšuje volnou frakci insulin-like growth faktoru, který stimuluje proliferaci a inhibuje apoptózu. Hypoadiponektinémie má též inverzní vztah s hladinou TNF- α , jež může nepříznivě ovlivňovat nádorovou proliferaci.

Přímých mechanismů, kterými může adiponektin ovlivňovat karcinogenezi je několik. Yokota a kolektiv popsali přímé negativní působení adiponektinu na hematopoézu. Potlačuje růst myelomonocytů *in vitro* a indukuje apoptózu myelomonocytárních progenitorových buněk leukemické řady (Yokota *et al*, 2000). Dále bylo zjištěno, že adiponektin inhibuje působení mnoha růstových faktorů tím, že se na ně naváže. Adiponektin zabraňuje vazbě na příslušné receptory a následnému spuštění nitrobuněčné kaskády dějů vedoucích k proliferaci u těchto

faktorů: HB EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), PDGF-BB (homodimer platelet-derived growth factoru s podjednotkou B) či bFGF (basic fibroblast growth factor). Ve výčtu intracelulárních molekul, které ovlivňuje adiponektin, mimo již zhora uvedené AMP-kinázu, NF-kappaB a PPAR- α receptory, patří i JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) a STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). JNK patří do rodiny MAP-kináz a podílí se na regulaci proliferace a apoptózy. STAT3 aktivuje dráhy podílející se na regulaci dějů ovlivňujících proliferaci, diferenciaci a apoptózu buněk. Oba systémy tedy hrají důležitou roli v karcinogenezi a růstu tumoru.

Adiponektin svým působením ovlivňuje i produkci RONS (reactive oxygen and nitrogen species). Inhibuje tvorbu superoxidu inhibicí enzymu NADPH oxidázy, což má protektivní účinky vůči rozvoji nádorového onemocnění.

Leptin

Základní informace

Leptin (řecky *leptos*- štíhlý) je neglykosylovaný polypeptid o molekulové hmotnosti 16 kDa, který je secernován především bílou tukovou tkání jako produkt genu *Ob* (*Obese*). Produkují ho nejenom zralé adipocyty, ale i kardiomyocyty a buňky krevních cév. Jeho hladiny v plazmě korelují s množstvím tukové tkáně, u štíhlých jedinců se pohybují mezi 1-10 ng/ml a u obézních mohou dosahovat hodnot až 100 ng/ml. Syntéza leptinu je významnější v subkutánní bílé tukové tkáni než ve viscerálním tuku a je stimulována interleukinem-6. Leptin se v centrální nervové soustavě, přesněji v kortexu, limbickém systému a hypothalamu, váže na receptory LEPR (dříve OBR), které patří do superrodiny cytokinových receptorů.

Mechanismus účinku

Leptin se podílí především na regulaci příjmu potravy a energetické bilance. V poslední době se však ukazuje, že má pleiotropní účinky. Leptin působí centrálně i periferně. V periferních tkáních ovlivňuje buňky pankreatu, jater a imunitního systému. V centrální nervové soustavě působí v kortexu, limbickém systému a především v hypothalamu, tam se váže na receptory LEPR (dříve OBR), které se vyskytují v jeho jádrech (např. nucleus arcuatus) zodpovědných za regulaci příjmu potravy a energetického výdeje. Mezi jeho hlavní účinky patří zvýšení energetického výdeje a snížení chuti k jídlu s následným snížením příjmu potravy, což evokuje myšlenku o regulaci hladiny leptinu jako adaptačním nástroji proti nežádoucím účinkům hladovění. Leptin zvyšuje tonus sympatiku, ovlivňuje hormonální, reprodukční a imunitní funkce. Leptin prostřednictvím svého receptoru aktivuje signální dráhu JAK-STAT3 fosforylací tyrosinu intracelulární domény receptoru. Mezi metabolické účinky leptinu patří stimulace proteosyntézy, stimulace aktivity enzymu glykogen syntázy, usnadnění vstupu glukózy do buňky, stimulace oxidace mastných kyselin, zabránění akumulace tuku v adipocytech a jiných buňkách a tím snížení lipotoxicity atd. Tyto metabolické účinky jsou zprostředkovány nejen aktivací signální cesty JAK-STAT3, ale i aktivací AMP-kinázy (játra, svaly), či ovlivněním koncentrace cAMP v adipocytech.

Klinický význam

Na kardiovaskulární aparát působí spíše negativně a mnozí autoři ho považují za nový rizikový faktor chorob kardiovaskulárního systému. Leptin vykazuje řadu proaterogenních vlastností. Leptin indukuje oxidační stres v endoteliálních buňkách (zvýšená produkce superoxidu v mitochondriích), stimuluje proliferaci a hypertrofii buněk hladkého svalstva cév, stimuluje tvorbu endothelinu-1 (ET-1) a monocytárního chemoatraktant proteinu 1 (MCP-1), zvyšuje agregaci krevních destiček, v centrálním nervovém systému aktivuje sympatický

nervový systém a tímto mechanismem se podílí na patogenezi hypertenze. Hladiny leptinu jsou taktéž pozitivně asociovány se vznikem nádorů prostaty, endometria, prsu a tračnicku. Leptin stimuluje buněčnou proliferaci prostřednictvím aktivace MAPK signální cesty u karcinomu prostaty, MCF-7 signální cesty u karcinomu prsu či dalších signálních cest jako jsou např. STAT3, ERK, AP-1. Důležitou roli hraje i při metastazování, protože podporuje angiogenezi. Tyto poznatky naznačují, že by leptin mohl být důležitým pojítkem mezi obezitou a vznikem malignit.

Literatura

1. Cowey S., Hardy RW. The metabolic syndrome: A high-risk state for cancer? *Am J Pathol* 2006; 169: 1505-1522.
2. Corley DA., Kubo A., Zhao W. Abdominal Obesity and the Risk of Esophageal and Gastric Cardia Carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 352-358.
3. Fujisawa T., Endo H., Tomimoto A., et al. Adiponectin suppresses colorectal carcinogenesis under the high-fat diet condition. *Gut* 2008; 57: 1531-1538.
4. Baillargeon J., Rose DP. Obesity, adipokines, and prostate cancer. *Int J Oncol* 2006; 28: 737-745.
5. Kelesidis I., Kelesidis T., Mantzoros CS. Adiponectin and cancer: a systematic review. *Br J Cancer* 2006; 94: 1221-1225.
6. Longo VD., Fontana L. Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 89-98.
7. Krechler T., Zeman M., Vecka M., et al. Leptin and adiponectin in pancreatic cancer: connection with diabetes mellitus. *Neoplasma* 2011; 58: 58-64.

Podporováno VZ MSM 0021620820 a IGA MZ ČR NS9769-4

ENDOGLIN AS A POSSIBLE MARKER OF ATHEROSCLEROSIS AND STATIN TREATMENT EFFICIENCY

P. Nachtigal, L. Večeřová, J. Rathouská, Z. Stráský

Charles University in Prague/ Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Department of Biological and Medical Sciences Heyrovskeho 1203, Hradec Kralove 500 05, Czech Republic

1. Introduction

TGF β cytokine was first isolated from neoplastic mouse tissue by Moloney sarcoma virus (Assoian, et al., 1983). TGF- β 1 can bind a heteromeric complex of type I and type II transmembrane serine/threonine kinase receptors. This complex is usually formed by ligand, one TGF- β type II receptor (T β R-II) and two TGF- β type I receptors called activin receptor-like kinase (ALK) (ten Dijke and Hill, 2004). This process can be affected by type III receptor known as endoglin (CD105) (Grainger, 2007).

Endoglin plays role in many pathological situations including Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT), cancer (Perez-Gomez, et al., 2010), angiogenesis (ten Dijke, et al., 2008), and more recently also in metabolic and cardiovascular diseases including preeclampsia (De Vivo, et al., 2008), hypertension and diabetes mellitus (Blazquez-Medela, et al., 2010; Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010). We would like to summarize some information about endoglin role in atherosclerosis.

2. Endoglin structure and expression

Endoglin (CD 105, TGF- β receptor III, ENG) is a homodimeric membrane glycoprotein that plays a regulatory role in several TGF- β pathways (Ma, et al., 2000 1612). Endoglin is a dimer composed of 95 kDa disulfide-linked subunits (Cheifetz, et al., 1992; Zhang, et al., 1996) involves an extracellular domain of 561 amino acid residues, a single transmembrane domain of 25 amino acid residues, and a short intracellular domain of 47 amino acids, that does not include a signal transduction domain (Gougos and Letarte, 1990).

Endoglin expression is restricted primarily to cells found in the vessel wall (Conley, et al., 2000) including endothelial cells (ECs), monocyte/macrophages, as well as by various mesenchymal cells, including fibroblasts and vascular smooth muscle cells (SMCs) (Gougos, et al., 1992; Qu, et al., 1998; St-Jacques, et al., 1994).

In general, endoglin expression is strongly related to cardiovascular system development, vascular development, angiogenesis, and vascular homeostasis (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

3. Endoglin interplay with other members of the pathway

Endoglin in association with TGF- β receptors II and I (ALK-1 and ALK-5), can bind TGF- β 1 and TGF- β 3 isoforms and form a functional receptor complex (Barbara, et al., 1999). Endoglin is not the true receptor but it strongly modulates activities (phosphorylation status) of TGF- β RII (Guerrero-Esteo, et al., 2002), ALK-1 (Guerrero-Esteo, et al., 2002; Lebrin, et al., 2004) and ALK-5 (Guerrero-Esteo, et al., 2002). In general, recent studies have revealed interplay between two signaling pathways and endoglin. Endoglin/ALK-1/Smad1/5 signaling has been shown to stimulate endothelial cell migration, proliferation and tube formation resulting in increased angiogenesis (ten Dijke, et al., 2008). On the contrary, activation of endoglin/ALK-5/Smad2 pathway inhibits the activity of endothelial cells, blocks angiogenesis by inhibition of EC proliferation, tube formation and migration, and keeps endothelium quiescent (Goumans, et al., 2009; Tian, et al., 2010).

4. Endoglin and endothelial NO synthase

Nitric oxide synthase is a key enzyme responsible for the production of NO by endothelium (Sessa, 2004). Its expression and activity is very important with respect to endothelial protection, and its decreased expression is related to development of endothelial dysfunction, the key step in atherogenesis (Napoli, et al., 2006).

There are several papers, which showed strong relationship between endoglin expression and eNOS expression and activity.

Jerkic et al demonstrated that endoglin expression is strongly related to eNOS expression in mice. They showed decreased levels of eNOS in endoglin deficient mice (Eng^{+/-} mice), which resulted in impaired endothelium-dependent vasodilation in these mice (Jerkic, et al., 2004). In addition, Toporsian et al. found that endoglin is an essential component of the eNOS activation complex, stabilizes eNOS protein, and facilitates the association of eNOS with Hsp90, which indicates its crucial role in endothelial cell function, and the regulation of local vascular tone (Toporsian, et al., 2005). In addition Santibanez et al. clearly showed that endoglin increases Smad2 levels, Smad2 phosphorylation and Smad2 stability, which results in increase eNOS expression both in the absence and in the presence of exogenous TGF- β in endothelial cells (Santibanez, et al., 2007). These data suggest that endoglin can regulate function of endothelium via eNOS proposing its role atherogenesis.

5. Endoglin blood serum levels in human atherosclerosis

In general, a soluble form of endoglin plays a central role in preeclampsia, a disease characterized by hypertension and severe alterations in placental circulation (Venkatesha, et al., 2006). Moreover, increased levels of soluble endoglin were related with diabetes-associated vascular pathologies such as hypertension, endothelial dysfunction and cardiovascular risk, which was nicely reviewed recently (Blazquez-Medela, et al., 2010). In addition, there are several studies showing the expression of endoglin in blood serum in patients with hypercholesterolemia and atherosclerosis. The first evidence of increased levels of endoglin in patients with hypercholesterolemia come from Blann et al. (Blann, et al., 1996). They speculated that increased endoglin levels could be related to endothelial damage/dysfunction. On the other hand Li et al., demonstrated lower levels of endoglin and TGF- β 1 in patients with severe coronary atherosclerosis when compared with patients with mild atherosclerosis or controls. They suggested that this decrease of both endoglin and TGF- β 1 is the consequence of formation of TGF- β 1/endoglin complexes in blood serum. They also showed that endoglin levels increase at early stages of atherogenesis due to damage of endothelial cells and than they are decreased in latter stages of atherosclerotic process, in patients with significant coronary artery disease in all three coronary arteries on coronary angiograms (Li, et al., 2000).

In the study of Blaha et al, showed that endoglin levels are increased in patients with familial hypercholesterolemia when compared with control group. In addition endoglin serum levels were significantly lower after series of extracorporeal eliminations, more after rheophereses when compared to LDL-aphereses (Blaha, et al., 2008). Surprisingly, reduced levels of endoglin did not correlate with cholesterol levels. Since endoglin levels were reduced together with CRP levels and sCD40 levels they suggested that reduced endoglin levels might be related to improvement of endothelial dysfunction and decreased activity of immune system after removal of atherogenic substances during these extracorporeal eliminations (Blaha, et al., 2008).

In general it can be concluded that monitoring of endoglin blood serum levels in atherosclerosis could reflect the changes of cholesterol levels in patients, and moreover it can be useful in predicting of early or advanced atherosclerotic changes in coronary arteries.

Additionally, the monitoring of endoglin levels could be useful in evaluating of the treatment benefit at least in extracorporeal eliminations.

6. Endoglin expression in human and porcine atherosclerotic and non-atherosclerotic vessels

The fact, that endoglin is expressed by endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages show its possible role in atherogenesis. The question is, whether its role is pro-atherogenic or anti-atherogenic?

Conley et al. studied the expression of endoglin in human atherosclerotic plaques (Conley, et al., 2000). The expression of endoglin was very weak in normal non-atherosclerotic aortas. They showed strong endoglin expression by smooth muscle cells in advanced atherosclerotic plaques where its expression appeared to be independent of SMC morphology and the degree of leukocyte infiltration. Conley et al. suggested that increased endoglin expression by smooth muscle cells of atherosclerotic plaques could be attributed to its normal response to injury action, where endoglin participate in the repair of the vessel wall suggesting that endoglin participates in atherogenesis (Conley, et al., 2000).

Other author showed similar results. Endoglin expression was strongly increased in smooth muscle cells 3,7, and 14 days after angioplasty (Ma, et al., 2000). They also demonstrated stronger endoglin expression in endothelium and smooth muscle cells in media of diseased coronary endarterectomy specimens (Ma, et al., 2000).

Strong up-regulation of endoglin expression is also detected in neovessels in advanced atherosclerotic lesions. Li et al. showed weak or no expression in normal arteries but strong expression in atherosclerotic arteries predominantly in microvessels of lipid core and very weak in macrophages and smooth muscle cells. Thus, they suggested participation of endoglin in neovascularization in atherosclerotic plaques (Li, et al., 2006). Additionally, endoglin expression was associated with hypoxia markers (HIF-1 alpha) in atherosclerotic carotid arteries. The staining was strong in morphologically different neovessels within the carotid plaque (Luque, et al., 2008).

Bot et al showed different results when compared to previously described studies. They focused on the expression of endoglin in carotid endarterectomy together with Smad2/3, transcription factor early growth response-1 (EGR-1) and collagen production. They showed endoglin expression in intraplaque vessels (endothelial cells), macrophages and smooth muscle cells. Moreover, endoglin expression was higher in plaques containing higher levels of collagen and less level of thrombi, suggesting endoglin expression is related with more stable plaque phenotype.

7. Endoglin expression in mice atherosclerosis

Several papers published by our group showed some interesting outcomes with respect to endoglin expression in mice aorta and endoglin levels in blood serum. In the first place, endoglin is expressed almost exclusively by luminal endothelial cells in mice aorta (Nachtigal, et al., 2009). Moreover, it was demonstrated that endoglin is co-expressed with downstream signaling markers like ALK-1, ALK-5, Smad2 and eNOS in aortic endothelium in mice. In another study, we showed that hypercholesterolemia increases endoglin levels in blood and simultaneously decreases its expression in aorta, together with atherosclerosis protective marker such as p-Smad2, followed by increased plaque size (Strasky, et al., 2011). In another study, we focused on the expression of endoglin in mice after atorvastatin treatment. In general, atorvastatin treatment increases endoglin expression in aorta beyond its lipid lowering effects (Vecerova et al. accepted paper) and also together with hypolipidemic effects of atorvastatin (Nachtigal, et al., 2009). Additionally, atorvastatin was also able to

decrease endoglin levels in blood and simultaneously increase its expression in aorta (unpublished results).

Conclusion

In conclusion, endoglin seems to play important role in atherogenesis by affecting smooth muscle cells activity and differentiation, formation of neovessels in advanced atherosclerotic lesions, stabilizing of atherosclerotic plaques via increased collagen production and possibly by improving of endothelial dysfunction via increased expression of eNOS. Endoglin serum levels might also be measured both in patients and experimental mice where they could reflect changes of serum cholesterol levels and therapeutic intervention by LDL-apheresis and/or statin treatment. Despite the fact it is still impossible to determine pro- or anti-atherogenic effects of endoglin its monitoring in blood serum and in vessels might give us information about atherosclerotic process or treatment efficacy.

Reference list

- Assoian, R.K., *et al.* (1983) Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization, *J Biol Chem*, 258, 7155-7160.
- Barbara, N.P., Wrana, J.L. and Letarte, M. (1999) Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily, *J Biol Chem*, 274, 584-594.
- Blaha, M., *et al.* (2008) Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia, *Atherosclerosis*, 197, 264-270.
- Blann, A.D., *et al.* (1996) Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis, *Atherosclerosis*, 120, 221-226.
- Blazquez-Medela, A.M., *et al.* (2010) Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients, *BMC Med*, 8, 86.
- Conley, B.A., *et al.* (2000) Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques, *Atherosclerosis*, 153, 323-335.
- De Vivo, A., *et al.* (2008) Endoglin, PlGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia, *Acta Obstet Gynecol Scand*, 87, 837-842.
- Gougos, A. and Letarte, M. (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells, *J Biol Chem*, 265, 8361-8364.
- Gougos, A., *et al.* (1992) Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts, *Int Immunol*, 4, 83-92.
- Goumans, M.J., Liu, Z. and ten Dijke, P. (2009) TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction, *Cell Res*, 19, 116-127.
- Grainger, D.J. (2007) TGF-beta and atherosclerosis in man, *Cardiovasc Res*, 74, 213-222.
- Guerrero-Esteo, M., *et al.* (2002) Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II, *J Biol Chem*, 277, 29197-29209.
- Cheifetz, S., *et al.* (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells, *J Biol Chem*, 267, 19027-19030.
- Jerkic, M., *et al.* (2004) Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation, *Faseb J*, 18, 609-611.
- Lebrin, F., *et al.* (2004) Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction, *EMBO J*, 23, 4018-4028.
- Li, C., *et al.* (2006) A comparative study of neovascularisation in atherosclerotic plaques using CD31, CD105 and TGF beta 1, *Pathobiology*, 73, 192-197.

- Li, C.G., *et al.* (2000) The significance of CD105, TGFbeta and CD105/TGFbeta complexes in coronary artery disease, *Atherosclerosis*, 152, 249-256.
- Lopez-Novoa, J.M. and Bernabeu, C. (2010) The physiological role of endoglin in the cardiovascular system, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299, H959-974.
- Luque, A., *et al.* (2008) Overexpression of hypoxia/inflammatory markers in atherosclerotic carotid plaques, *Front Biosci*, 13, 6483-6490.
- Ma, X., *et al.* (2000) Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 2546-2552.
- Nachtigal, P., *et al.* (2009) Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice, *J Atheroscler Thromb*, 16, 265-274.
- Nachtigal, P., *et al.* (2009) Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study, *Histol Histopathol*, 24, 1499-1506.
- Napoli, C., *et al.* (2006) Nitric oxide and atherosclerosis: an update, *Nitric Oxide*, 15, 265-279.
- Perez-Gomez, E., *et al.* (2010) The role of the TGF-beta coreceptor endoglin in cancer, *ScientificWorldJournal*, 10, 2367-2384.
- Qu, R., Silver, M.M. and Letarte, M. (1998) Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation, *Cell Tissue Res*, 292, 333-343.
- Santibanez, J.F., *et al.* (2007) Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling, *J Cell Physiol*, 210, 456-468.
- Sessa, W.C. (2004) eNOS at a glance, *J Cell Sci*, 117, 2427-2429.
- St-Jacques, S., *et al.* (1994) Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells, *Endocrinology*, 134, 2645-2657.
- Strasky, Z., *et al.* (2011) Cholesterol Effects on Endoglin and Its Downstream Pathways in ApoE/LDLR Double Knockout Mice, *Circ J*, 75, 1747-1755.
- ten Dijke, P., Goumans, M.J. and Pardali, E. (2008) Endoglin in angiogenesis and vascular diseases, *Angiogenesis*, 11, 79-89.
- ten Dijke, P. and Hill, C.S. (2004) New insights into TGF-beta-Smad signalling, *Trends Biochem Sci*, 29, 265-273.
- Tian, F., *et al.* (2010) Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro, *Biochem Biophys Res Commun*, 392, 283-288.
- Toporsian, M., *et al.* (2005) A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia, *Circ Res*, 96, 684-692.
- Venkatesha, S., *et al.* (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia, *Nat Med*, 12, 642-649.
- Zhang, H., *et al.* (1996) Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells, *J Immunol*, 156, 564-573.

Acknowledgments

This work was supported by grants from The Grant Agency of Charles University in Prague, numbers 129208/C and 137310/C, grant MSM 002162082, grant SVV/2011/263-003 and Research project MZO 00179906.