



ATHEROSKLEROSA

Praha 2013



ATHEROSKLEROSA

Praha 2013

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, praktických lékařů pro děti a dorost, klinické
výživy a intenzivní metabolické péče, obesitologickou a diabetologickou

4. INTERNÍ KLINIKA 1. LF UK

Vás vítají na sympoziu s edukačním programem

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

2 0 1 3

diagnostika, léčba, prevence v dětském i dospělém věku

P r a h a 11. - 13. září 2013

Hlavní název: ATHEROSKLEROSA 2013
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 2013
Cena: neprodejné

ISBN 978-80-905595-0-9

ČESTNÉ PŘEDSEDNICTVO

Prof. MUDr. Aleksi Šedo, 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, Ludmila Kazdová, Jozef Kollár, Eva Kohlíková, Petr Nachtigal,
František Stožický, Eva Tvrzická, Miloš Votruba, Miroslav Zeman, Aleš Žák**

ADRESA SYMPOSIA

Lékařský dům

Sokolská 31

120 26 Praha 2

tel.: 224 266 201-4

O B S A H

Autor	Str.
Cahová	1
Dostálová	6
Faldynová	11
Hyánek	12
Chrprová	14
Kohlíková	19
Kazdová	S1
Kodydková	S5
Koprovičová	23
Macášek	27
Malínská	34
Nachtigal	S12
Oliyarnyk	37
Páleníčková	42
Poruba	47
Sabolová	51
Schusterová	60
Staňková	67
Škop	68
Trnovská	76
Vecka	S17
Vlčková	82
Zeman	S23
Žák	S32
Všeobecná doporučení pro léčbu dyslipidemií	S47

* Experimentální práce – průběžné číslování

* Přehledové články – S....

Redakce: S. Eichlerová, E. Tvrzická
4. interní klinika 1. LF UK

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, praktických lékařů pro děti a dorost, klinické
výživy a intenzivní metabolické péče, obesitologickou a diabetologickou

4. INTERNÍ KLINIKA 1. LF UK

Vás vítají na sympoziu s edukačním programem

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

2 0 1 3

diagnostika, léčba, prevence v dětském i dospělém věku

P r a h a 11. - 13. září 2013

Hlavní název: ATHEROSKLEROSA 2013

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 2013

Cena: neprodejné

ČESTNÉ PŘEDSEDNICTVO

Prof. MUDr. Aleksi Šedo, 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, Ludmila Kazdová, Jozef Kollár, Eva Kohlíková, Petr Nachtigal,
František Stožický, Eva Tvrzická, Miloš Votruba, Miroslav Zeman, Aleš Žák**

ADRESA SYMPOSIA

Lékařský dům
Sokolská 31
120 26 Praha 2

tel.: 224 266 201-4

O B S A H

Autor	Str.
Cahová	1
Dostálová	6
Faldynová	11
Hyánek	12
Chrprová	14
Kohlíková	19
Kazdová	S1
Kodydková	S5
Koprovičová	23
Macášek	27
Malínská	34
Nachtigal	S12
Oliyarnyk	37
Páleníčková	42
Poruba	47
Sabolová	51
Schusterová	60
Staňková	67
Škop	68
Trnovská	76
Vecka	S17
Vlčková	82
Zeman	S23
Žák	S32
Všeobecná doporučení pro léčbu dyslipidemií	S47

* Experimentální práce – průběžné číslování

* Přehledové články – S....

Redakce: S. Eichlerová, E. Tvrzická
4. interní klinika 1. LF UK

THE EFFECT OF CARNITINE SUPPLEMENTATION IN METABOLIC SYNDROME

M. Cahová¹, V. Škop¹, J. Trnovská¹, O. Oliyarnyk¹, P. Chrastina², H. Hansíková³, H. Malínská¹, Z. Papáčková¹, E. Paleníčková¹, L. Kazdová¹

¹Center for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague; ²Institute of Inherited Metabolic Disorders of 1st Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Charles University, Prague; ³Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

Abstract

Carnitine attracts growing attention as a possible therapeutics in the treatment of metabolic syndrome associated disorders. Many studies demonstrated positive effect of carnitine supplementation on glucose tolerance and/ or insulin sensitivity in both humans and animals but there is also considerable number of studies that did not find any effect. The aim of our study was to estimate the effect of carnitine supplementation on overall and peripheral insulin sensitivity in animal model of insulin resistance, hereditary hypertriglyceridemic rats (HHTg). We showed that serum levels of free carnitine and some acylcarnitine species were significantly reduced in HHTg rats and that this deficiency was compensated by carnitine supplementation. We further found that although the overall glucose tolerance measured as OGTT was not affected by carnitine administration, several parameters indicated the improvement of lipid metabolism – lower fasting triglyceridemia, greater drop in FFA and TAG levels during OGTT and significantly decreased liver TAG content. We further demonstrated some improvement in peripheral insulin sensitivity. In conclusion, we found that some metabolic syndrome related disorders could be reversed by carnitine supplementation. The beneficiary effect of carnitine could be explained by the improved substrate oxidation at least in adipose tissue.

Introduction

The metabolic syndrome is a clinical disorder characterized by the clustering of multiple risk factors for diabetes and cardiovascular disease including dyslipidemia, insulin resistance, and increased blood pressure. It has been hypothesized that alterations in mitochondrial oxidative activity may directly impact adaptive responses to over nutrition, causing an imbalance between oxidative activity and nutrient load, ultimately leading to sustained accumulation of lipid oxidative metabolites (Szendroedi 2011).

Diet-induced and genetic forms of glucose intolerance are associated with high rates of incomplete fat oxidation (Koves et al. 2008) and accumulation of numerous TAG metabolism intermediates. Transport of long-chain fatty acyl groups into the mitochondria requires esterification and de-esterification with carnitine by enzymes carnitine palmitoyl transferase I and II bound to the outer and inner faces of the inner mitochondrial membrane. Carnitin deficiency results in accumulation of lipids within skeletal muscle myocardium and liver. Excessive fat supply in combination with physical inactivity results in a persistent mismatch between β -oxidation and tricarboxylic acid (TCA) cycle activity. Growing number of studies have reported a negative association between circulating and/or tissue acylcarnitines and glucose tolerance but until now, it is not clear whether (acyl)carnitine have positive or negative role (Muoio 2010).

The purpose of our study was to estimate the effect of carnitine supplementation on overall and peripheral insulin sensitivity in animal model of insulin resistance, hereditary

hypertriglyceridemic rats (HHTg) (Vrana 1990). We further focused on the identification of some mechanisms that could contribute to the effect of carnitine.

Methods

Male HHTg rats (420 ± 8 g) fed standard chow diet were randomly divided into two groups ($n = 8$). One of them was provided 1% carnitine in drinking water for 8 weeks (HHTg + carnitine) while the second one served as control (control HHTg). Carnitine and acylcarnitine species were detected by mass spectrometry. The adipose tissue and skeletal muscle insulin sensitivity was determined *in vitro* according to the ^{14}C glucose incorporation into neutral lipids and glycogen, resp. TAG, FFA and glucose concentrations were determined using commercially available kits.

Results

Metabolic characteristics

During the experimental period, HHTg rats exhibited small but stable and significant weight gain. In contrast, the average weight in the group supplemented with carnitine remained unchanged, in some animals being even 2-3 g lower at the end than at the beginning of the feeding. Fasting triglyceridemia was significantly lower in HHTg + carnitine compared with controls (4.1 ± 0.27 vs 5.5 ± 0.4 , $p < 0.02$). Fasting glycemia (5.3 ± 0.3 vs 5.7 ± 0.3 mmol/l, n.s.), fasting FFA (3.14 ± 0.15 vs 3.2 ± 0.19 nmol/l, n.s.) as well as fed triglyceridemia (8.2 ± 0.4 vs 8 ± 0.5 mmol/l, n.s.) were comparable in both groups. Carnitine administration led to the significant elimination of liver TAG content (7.9 ± 0.7 vs 10.5 ± 0.6 , $p = 0.026$). We did not find any differences in TAG content either in skeletal muscle or in the heart. The above mentioned data indicate that carnitine administration affects predominantly some aspects of lipid metabolism.

Glucose tolerance

Carnitine administration did not affect the overall glucose tolerance measured as an oral glucose tolerance test (OGTT). Nevertheless, the FFA content 60 min after the glucose load was significantly lower in HHTg + carnitine compared with HHTg controls (fig. 1A,B) what indicates the increased antilipolytic effect of insulin in this group.

Peripheral insulin sensitivity

As shown on fig. 2A, the adipose tissue of HHTg controls was completely insulin resistant. In HHTg + carnitine we found a tendency to the increase of insulin-stimulated and to the decrease of basal ^{14}C -glucose incorporation into neutral lipids. Albeit both these processes were insignificant itself, the insulin responsiveness of adipose tissue in HHTg + carnitine was restored. The insulin sensitivity in skeletal muscle, measured as ^{14}C -glucose incorporation into glycogen in diaphragm, was maintained in HHTg controls (fig. 2B). Even though, carnitine administration led to the significant enhancement of insulin stimulated glycogenesis. We further wanted to know whether the changes in insulin sensitivity were associated with the reduction of incomplete oxidation products content in the tissues. As shown on fig. 3, the ASP content was significantly decreased in adipose tissue of HHTg + carnitine compared with HHTg controls. We found no differences in ASP content in skeletal muscle (diaphragm) between the groups. Taken together, we found that carnitine administration enhanced insulin sensitivity in peripheral tissues and that this effect may be, at least in adipose tissue, be associated with the better substrate oxidation.

Discussion

Treatment of metabolic syndrome disorders represents a challenging task considering the growing number of patients in so-called developed countries. Recently, personalized metabolic therapy using small molecules including nutrients as metabolic modulators is

attracting intensive attention. Carnitine that performs an irreplaceable role in the metabolism of fatty acids represents a promising target.

In majority of studies (11 out of 16) carnitine supplementation in both humans and animals demonstrate an improvement of glucose tolerance and/or insulin sensitivity, in particular during insulin-resistant states (Ringseis 2012). Moreover, the majority of human studies in diabetic subjects reported diminished plasma free carnitine concentrations, even though the levels were still within or only slightly below the physiological range reported for healthy subjects. In contrast, less consistent results are available from studies investigating the association between carnitine deficiency and glucose intolerance. To our knowledge, there is only one model of primary carnitine deficiency, juvenile visceral steatosis (JVS) mice. In this model one study reported the decreased glucose tolerance (Hotta 1996) while the other found no effect on parameters of glucose and insulin homeostasis (Ushikai 2011). Secondary carnitine deficiency could be of either drug or dietary origin. Valproic acid, a commonly used anti-epileptic drug, is associated with the decreased carnitine biosynthesis and glucose intolerance has been described in patients chronically treated with this drug (Cuturic 2011). On the other hand, another drug, pivalate, induces carnitine deficiency due to the excessive loss of carnitine via the urine. Two studies on rat model proved a significant decrease of plasma carnitine level but had not any impact on parameters of glucose tolerance (Sawada 1996, Broderick 1995). It has been demonstrated that long term high fat diet impairs whole body carnitine status due to the compromising the capacity of the liver to synthesize and take up the carnitine. Noland et al. (2009) clearly showed that carnitine insufficiency contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance. The same relationship could be observed in several rat models of genetic obesity. Importantly, oral carnitine supplementation reversed these perturbations in concert with an improved glucose tolerance. In sharp contrast to the above-mentioned studies are three studies from the same group demonstrated in different animal models (ICR mice [Liepinsh 2008], Goto-Kakizaki rats [Liepinsh 2009], obese Zucker rats [Liepinsh 2011]) that mildronate, by reducing plasma and heart carnitine concentrations, lowers plasma glucose and insulin concentration and/or protects against diabetic complications.

Because of these conflicting data, we decided to test the effect of carnitine on parameters associated with glucose tolerance in a unique model of insulin resistance, non-obese HHTg rats. A number of other previously recognised facets of the metabolic syndrome, such as hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia, resistance to insulin action, impaired glucose tolerance, and elevated blood pressure, have been observed in this HHTg strain (Vrana 1990). In this report, we show for the first time that serum levels of free carnitine and some acylcarnitine species (C4, C12, C14, C14:1, C 14:2, C16, C18, C18:1) are significantly reduced in HHTg rats. The acylcarnitine metabolites are by-products of substrate degradation formed from their respective acyl-CoA intermediates by a family of carnitine acyltransferases that reside principally (but not exclusively) in mitochondria. The carnitine and acylcarnitine deficiency was compensated by carnitine supplementation.

We found that although the overall glucose tolerance measured as OGTT was not affected by carnitine administration, several parameters indicated the improvement of lipid metabolism – lower fasting triglyceridemia, greater drop in FFA and TAG levels during OGTT and significantly decreased liver TAG content. We further demonstrated some improvement in peripheral insulin sensitivity.

Considering the previously proposed mechanisms of carnitine action, we concentrated on two particular processes that could contribute to the observed beneficiary effect of carnitine. The term “ASP” is the overall denomination for the intermediates of TCA (Krebs) cycle and their accumulation indicates the incomplete substrate oxidation. In our model, carnitine administration resulted in a significant decrease of ASP content in adipose tissue what well

correspond with the restoration of adipose tissue insulin sensitivity. We did not find any effect of carnitine supplementation on ASP content in diaphragm. Nevertheless, the skeletal muscle insulin sensitivity was not affected in our model what can explain the lack of carnitine effect on skeletal muscle. In the presented study, the animals were quite young (4 month) and in spite of established hyperinsulinemia, the muscle insulin resistance has not been developed yet. We suggest that also the lack of carnitine effect in OGTT may be the consequence of still preserved insulin sensitivity of skeletal muscle that is the main contributor to glucose removal.

The significant reduction of liver TAG content suggest a tentative possibility that carnitine stimulated the fatty acid oxidation at least in the liver. This hypothesis is supported by the observed lack of weight gain in HHTg + carnitine group but it needs further exploration.

In conclusion, we found that the non-obese genetic model of insulin resistance associated with hypertriglyceridemia there is deficient in serum carnitine content and that some metabolic syndrome related disorders could be reversed by carnitine supplementation. The beneficial effect of carnitine could be explained by the improved substrate oxidation at least in adipose tissue.

This study was supported by MH CR-DRO (“Institute for Clinical and Experimental Medicine – IKEM, IN 00023001”).

References

- SZENDROEDI J., PHIELIX E., RODEN M. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 13: 92–103.
KOVES TR., USSHER JR., NOLAND RC., et al. *Cell Metab* 2008; 7: 45-56.
MUOIO DM. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801: 281-288.
VRÁNA A., KAZDOVÁ L. *Transplant Proc* 1990; 22: 2579.
HOTTA K., KUWAJIMA M., ONO A., et al. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 32: 117–123.
USHIKAI M., HORIUCHI M., KOBAYASHI K., et al. *Mol Genet Metab* 2011; 102: 349–355.
CUTURIC M., ABRAMSON RK., MORAN RR., et al. *J Psychiatr Pract* 2011; 17: 35-40.
NAKAJIMA H., KODO N., INOUE F., et al. *J Nutr* 1996; 126: 1683-1687.
BRODERICK TL., CHRISTOS SC., WOLF BA., et al. *Metabolism* 1995; 44: 499–505.
NOLAND RC. *J Biol Chem* 2009; 284: 22840–22852.
LIEPINSH E., VILSKERSTS R., SKAPARE E., et al. *Life Sci* 2008; 83: 613–619.
LIEPINSH E., VILSKERSTS R., ZVEJNIECE L., et al. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 1549–1556.
LIEPINSH E., SKAPARE E., SVALBE B., et al. *Eur J Pharmacol* 2011; 658: 277–283.

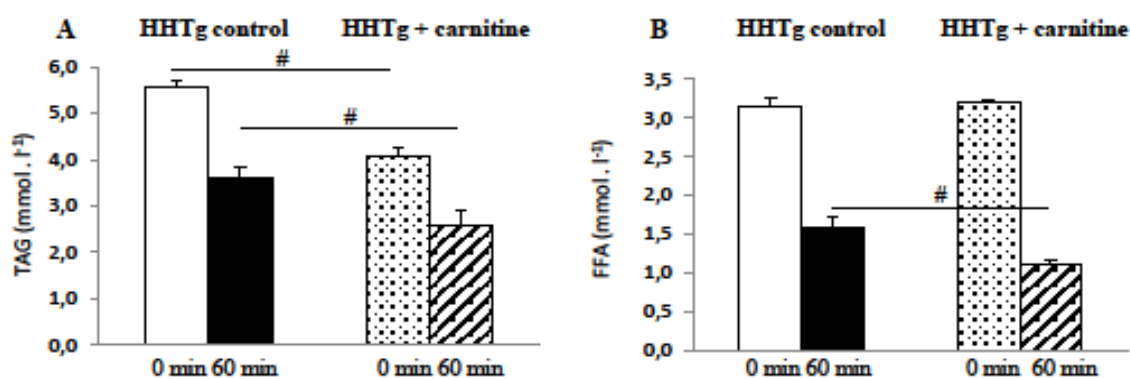


Figure 1 The effect of carnitine on triacylglycerol (A) and free fatty acid (B) content during oral glucose tolerance test. # $p < 0.05$ carnitine-treated vs carnitine untreated

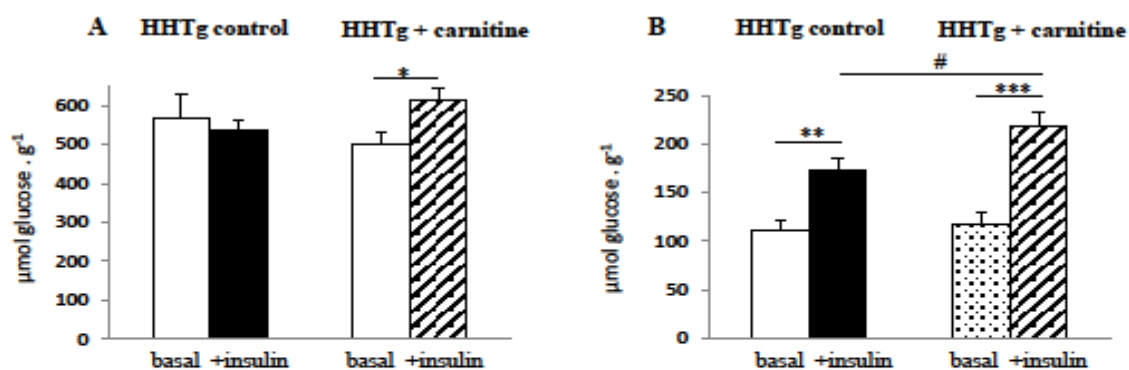


Figure 2 The effect of carnitine on basal and insulin-stimulated incorporation of ¹⁴C-glucose into neutral lipids in adipose tissue (A) and into glycogen in diaphragm (B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.05$ insulin-treated vs basal; # $p < 0.05$ carnitine-treated vs carnitine untreated

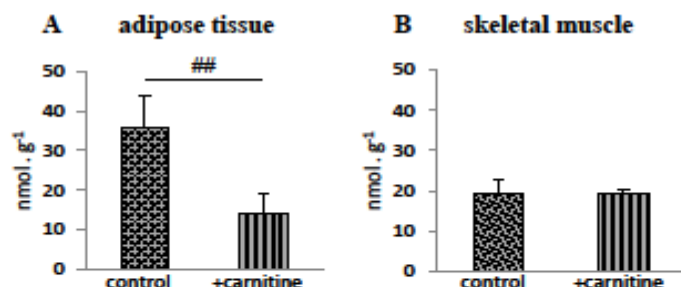


Figure 3 The effect of carnitine on TCA intermediate (ASP) content in adipose tissue (A) and diaphragm (B). ## $p < 0.01$ carnitine-treated vs carnitine untreated

NASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY - VÝZNAM VE VÝŽIVĚ A OBSAH V POTRAVINÁCH

SATURATED FATTY ACIDS - IMPORTANCE FROM THE NUTRITION POINT OF VIEW AND CONTENTS IN FOOD PRODUCTS

J. Dostálová, M. Doležal

Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice

Abstract

Influence of the saturated fatty acids (SFA) intake on the human organism and dietary guidelines for intake of individual groups of fatty acids are presented. The SFA contents in selected food products are presented as well. The high content of SFA was determined in many food products e.g. in chocolate products with added coconut fat, fat coatings on food products, ice creams, bakery products, pastry, dry soya beverages etc.

Úvod

Tuky, jedna ze tří hlavních živin, jsou živinou nejméně stabilní při technologickém zpracování a skladování surovin a potravin a jsou v současnosti nejdiskutovanější hlavní živinou ve vztahu k řadě závažných neinfekčních onemocnění hromadného výskytu, zejména nemocí srdce a cév. Pozitivní role tuků ve výživě je významná - jsou zdrojem energie, esenciálních mastných kyselin, v tuku rozpustných vitaminů, sterolů a dalších pozitivně působících látek. Vznikají z nich látky, které podmiňují charakteristické sensorické vlastnosti potravin a pokrmů a dodávají stravě jemnost a příjemnost při žvýkání a polykání. Negativně však působí vysoký příjem tuku, vysoký příjem cholesterolu, nevhodné složení mastných kyselin tuku tj. vysoký obsah nasycených mastných kyselin (SFA) a zejména *trans*-nenasycených mastných kyselin (TFA) a nízký obsah polyenových mastných kyselin (PUFA), zejména n-3 PUFA a dále antinutriční a toxické látky vznikající při technologickém zpracování a skladování tuků a potravin je obsahujících. V současné době se na negativní vliv vyššího příjmu cholesterolu neklade takový důraz jako v druhé polovině 20. století. Za daleko větší nebezpečí se považuje nevhodné složení mastných kyselin. Doporučený příjem jednotlivých skupin mastných kyselin podle Výživových doporučení pro obyvatelstvo ČR, které formulovala a v roce 2012 inovovala Společnost pro výživu je v tabulce I.

Tabulka I. Výživová doporučení pro příjem tuku a mastných kyselin¹

	% z celkového energetického příjmu
Tuk celkem	30 (70 g) - 35
SFA	< 10 (20 g)
PUFA (celkem)	7 - 10, poměr n-6:n-3 max. 5:1
TFA	< 1 (2,5 g)
MUFA	Dopočet

Obsah TFA v potravinách přestává být v současnosti aktuální – výrobci přestávají používat částečně ztužené tuky. Pozornost se nyní soustřeďuje na obsah SFA, jejichž vysoký příjem podporuje vznik zejména nemocí srdce a cév. V nových Výživových doporučeních USDA (2010)² je na snížení příjmu SFA kladen obzvláštní důraz. I v České republice se aktivně

podporuje snížení příjmu SFA např. v inovovaných výživových doporučeních Společnosti pro výživu je nově zařazeno doporučení ke snížení příjmu tuků obsahujících nasycené mastné kyseliny¹ a byla spuštěna kampaň „Nasycené škodí“, kterou organizuje Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP a podpořila ji Společnost pro výživu, Fórum zdravé výživy, Poradenské centrum výživa dětí a STOB³.

Lidský organismus využívá SFA pro různé fyziologické a strukturální funkce, ale vytváří si je v dostatečném množství, a proto není nutný příjem potravou. Vyšší příjem SFA je spojen s vyššími hladinami celkového a LDL cholesterolu v krvi, které jsou rizikovým faktorem nemocí srdce a cév. Ve většině výživových doporučeních se nasycené mastné kyseliny podle intenzity vlivu na hladiny krevních lipidů nerozlišují, ale v řadě literárních zdrojů se uvádí, že nasycené mastné kyseliny s krátkým a středním uhlíkovým řetězcem se metabolizují odlišně a krevní tuky neovlivňují. Hladiny krevních tuků zvyšují kyseliny laurová, myristová a palmitová, kyselina stearová se chová neutrálně.

V devadesátých letech došlo v ČR pokles příjmu SFA. Na začátku tisíciletí byl příjem SFA cca 18 % energie a nepředpokládá se zlepšení⁴. Příjem v USA byl v roce 2005-6 cca 11 %². Příjem < 10 % energie ze SFA a jejich náhrada MUFA nebo PUFA vede ke snížení hladin celkového a LDL cholesterolu a tudíž k menšímu riziku kardiovaskulárních onemocnění; snížení na < 7 % dále riziko snižuje².

Hlavními zdroji SFA v ČR již nejsou jen tuky živočišného původu, ale přibyly k nim výrobky, kde se používá kokosový a palmojádrový tuk a palmový olej. Jsou to např. čokoládové výrobky neoznačené jako „čokoláda“, polevy na müsli tyčinkách, mražených krémech, dortech a cukroví, mražené krémy s rostlinným tukem, cukrářské výrobky, rostlinné náhrady smetany a šlehačky, jíšky, dehydrované polévky, sušené sójové nápoje, potraviny smažené na palmovém oleji aj. Složení MK tuku výrobků z některých z výše uvedených skupin zakoupených v letech 2011-2012 je v následujících tabulkách.

Tabulka II. Složení mastných kyselin tuku 16 sezónních výrobků

	Název výrobku	TFA	SAFA	MUFA	PUFA
1	Sněhuliak/Anjel	0,46	93,11	5,48	0,95
2	Mikuláš	11,27	75,80	11,43	1,50
3	Arašíd.pochoutka	0,47	79,90	15,98	3,65
4	Chocolaterie	2,85	92,97	3,69	0,49
5	COSMO	0,62	92,65	5,68	1,05
6	Beti led.čokoláda	0,17	84,21	12,83	2,79
7	Kalendář	38,53	37,61	23,00	0,86
8	Chocolate Friedel	0,49	62,26	33,79	3,46
9	Svíčky	0,07	63,70	32,97	3,26
10	Baňka	1,80	93,42	4,10	0,68
11	Zlatá kolekce (hořká)	0,57	63,77	32,35	3,31
12	Zlatá kolekce (mléčná)	0,54	64,19	31,70	3,57
13	Beruška	1,83	93,31	4,18	0,68
14	Foukané	3,22	92,45	3,55	0,78
15	Salonky (čokoláda)	0,29	95,91	2,54	1,26
16	Salonky (náplň)	0,47	53,23	36,80	9,50

Tabulka III. Složení mastných kyselin tuku 4 výrobků imitujících čokoládu

	Název výrobku	TFA	SAFA	MUFA	PUFA
1	Mléčná	43,48	30,93	22,82	2,77
2	Arašídová pochoutka	0,54	78,38	17,41	3,67
3	Na vaření	31,98	44,42	22	1,6
4	Zora nugátová	0,79	90,99	6,12	2,1

Tabulka IV. Složení mastných kyselin tuku 4 cukrářských polev

	Název výrobku	TFA	SAFA	MUFA	PUFA
1	Poleva světlá	0,02	91,06	7,68	1,24
2	Cukr. poleva Bílá	2,49	94,38	2,73	0,4
3	Poleva Tmavá	0,11	90,91	7,57	1,41
4	Cukr. poleva Tmavá	44,79	37,7	15,99	1,52

Tabulka V. Složení mastných kyselin tuku polev na 31 müsli tyčinkách

	Název výrobku	TFA	SAFA	MUFA	PUFA
1	Simply Nut jogurt	3,97	81,00	11,94	3,09
2	Simply Nut kakao	31,79	39,89	25,49	2,83
3	Twiggy – švestka	35,98	39,92	22,51	1,59
4	CORNY Big Dark	0,08	62,47	33,36	4,09
5	BreakfastBar oSTRUŽINA	2,56	87,46	8,75	1,23
6	Albert oříšek+kar.	36,05	38,60	23,70	1,65
7	Albert jogurt+malina	37,17	39,49	22,04	1,30
8	Corny Chocolate	0,43	64,00	32,26	3,31
9	Corny jogurt+jahoda	0,48	81,60	14,89	3,03
10	Fly borůvka+jogurt	0,13	97,47	1,72	0,68
11	Fly banán+kakao	1,07	89,88	7,01	2,04
12	Maxi Nuta konopné	0,53	77,81	16,08	5,58
13	Nestlé Fitness	0,04	63,50	33,00	3,46
14	Crip Crop jogurt	0,12	97,10	2,08	0,70
15	Crip Crop čokoláda	0,40	84,62	13,09	1,89
16	Dobrá vláknina jogurt	0,18	95,80	2,85	1,17
17	Dobrá vláknina kakao	1,23	88,34	7,93	2,50
18	Müsli v jogurtě višň	2,71	92,17	3,85	1,27
19	FirstNice kakao	40,80	40,52	17,21	1,47
20	FirstNice jogurt	38,32	38,17	22,04	1,47
21	Maxi Nuta pistácie	0,10	91,91	6,07	1,92
22	Probiotic Line	0,30	90,96	6,86	1,88
23	Fit fruitík čokoláda	34,91	37,41	24,74	2,94
24	Fit fruitík jogurt	37,81	36,62	22,68	2,89
25	Jelly Juicy Cereal	1,38	90,35	5,48	2,79
26	Fit müsli jogurt	37,58	38,49	22,46	1,47
27	Fit müsli poleva	37,49	35,90	25,34	1,27
28	Juicy Bar	2,36	91,64	4,33	1,67
29	Cereo jogurt	37,59	39,99	21,27	1,15
30	Cereo kakao	32,50	47,15	19,32	1,03
31	SIRIUS Müsli	0,36	63,55	32,41	3,68

Tabulka VI. Složení mastných kyselin tuku sušených sójových nápojů z tržní sítě ČR zakoupených v letech 2009 a 2012

	Název výrobku	Obsah tuku (%)	TFA	SAFA	MUFA	PUFA
1	Soja Milk extra protein (2009)	10	0,1	95,0	2,1	2,7
2	Soja Milk vanilka (2009)	24	0,1	96,5	1,4	1,9
3	Soja Milk natural (2009)	24	0,5	93,2	3,5	2,6
4	SojaMilk Natural (2012)	21,0	0,1	96,5	1,4	2,0
5	SojaMilk Ca+Lecithin (2012)	20,4	0,1	97,1	1,0	1,8

Závěr

Příjem nasycených mastných kyselin ve stravě obyvatel vyspělých průmyslových zemí je příliš vysoký a měl by se snížit na méně než 10 % z celkového energetického příjmu tj. méně než 20 g/den. V praxi to znamená omezení příjmu živočišných tuků s výjimkou rybiho tuku. Větší nebezpečí než příjem tuků živočišných představuje příjem tuku kokosového, palmojadrového a palmového. Tyto tuky se stále více používají do různých výrobků, zejména jako náhrada částečně ztužených tuků, které mají vysoký obsah *trans*-nenasycených mastných kyselin, což z hlediska výživového není také příznivé (zejména z pohledu vlivu na krevní lipidy). Tropické tuky jsou relativně levné, mají vyhovující technologické vlastnosti, zejména texturní a tepelnou stabilitu. Jedná se zejména o následující výrobky: čokoládové výrobky neoznačené jako „čokoláda“, polevy na müsli tyčinkách, mražených krémech, dortech a cukroví, mražené krémy s rostlinným tukem, rostlinné náhrady smetany a šlehačky, jíšky, dehydrované polévky, cukrářské výrobky s tukovou náplní, sušené sójové nápoje a další.

Běžní spotřebitelé si negativní vliv, zejména na vznik kardiovaskulárních onemocnění, těchto výrobků neuvědomují a naopak např. müsli tyčinky považují za „**zdravé potraviny**“. Spotřebitelé, zvláště lidé ohrožení nemocemi srdce a cév, by měli sledovat nutriční složení výrobků. Řada výrobců obsah nasycených mastných kyselin uvádí. Surovinové složení ve většině případů vodítkem není, protože povinnost uvádět druh tuku nastane až v prosinci 2014. Dalšími vodítky jsou loga na obalu potravin např. GDA a Vím, co jím

Literatura

1. DOSTÁLOVÁ J., DLOUHÝ P., TLÁSKAL P. Výživová doporučení pro obyvatelstvo České republiky, *Výživa a potraviny* 2012, 67: 80-82, <http://www.vyzivaspol.cz/rubrika-dokumenty/konecne-zneni-vyzivovych-doporuceni.html>).
2. <http://fnic.nal.usda.gov/dietary-guidance/dietary-guidelines>.
3. <http://www.nasyceneskodi.cz/>
4. BRÁT J., DOSTÁLOVÁ J., POKORNÝ J. Výživová doporučení pro příjem lipidů a jejich plnění v České republice. *Výživa a potraviny* 2005; 60: 156-157.

GENETICKÉ PŘÍČINY HYPERCHOLESTEROLÉMIE – ANALÝZA GENŮ PRO LDL RECEPTOR, APOB A APOE – PARTIKULE URČUJÍCÍ HLADINU CHOLESTEROLU

L. Faldynová^{1,2}, P. Plevová^{1,2}, Š. Hilscherová², T. Král³, P. Kušnierová⁴, L. Pleva⁵, J. Zapletalová⁶

¹Ostravská univerzita v Ostravě, Lékařská fakulta, Syllabova 19, Ostrava-Zábřeh 703 00

²Oddělení lékařské genetiky, FN Ostrava, tř. 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba

³Interní klinika, FN Ostrava, tř. 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba

⁴Ústav laboratorní diagnostiky, FN Ostrava, tř. 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba

⁵Kardiovaskulární oddělení, FN Ostrava, tř. 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba

⁶Ústav lékařské biofyziky, LF UP v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

V roce 2011/2012 proběhl na našem pracovišti projekt, jehož cílem bylo zmapovat genetické parametry u 103 pacientů s klinickým obrazem odpovídajícím familiární hypercholesterolémii (FH).

Pacienti byli podrobeni sekvenační analýze genu *LDLR* a metodě MLPA pro vyloučení genomických delecí/duplikací genu *LDLR*. Současně byla provedena detekce mutace c.10580G>A (p.R3500Q) v genu *APOB* pro apolipoprotein B a genotypu ApoE2/E3/E4 v genu *APOE* pro apolipoprotein E pomocí metody analýzy křivek tání. Byla provedena analýza genotypů ApoE také ve dvou kontrolních skupinách a zpracována pomocí Fisherova přesného testu s Bonferroniho korekcí.

Patogenní mutaci způsobující FH, jsme identifikovali v genu *LDLR* u 15,5 % pacientů a v genu *APOB* u 2,9 % pacientů. Nalezené mutace korelovaly s biochemickými parametry a objasnily abnormální lipidemický profil u celkově 18,4 % pacientů. U 38,8 % pacientů byly nalezeny abnormální izoformy apolipoproteinu E (E4, E2). Tyto varianty byly nalezeny u 29,6 % (NS, $p = 0,576$) a 34,2 % (NS, $p = 0,334$) osob kontrolních skupin.

Pomocí molekulárně genetické analýzy genů *LDLR* a *APOB* jsme objasnili 18,4 % případů závažných hypercholesterolémii. Ačkoli zastoupení abnormálních genotypů v genu *APOE* (E4, E2) bylo častější u hypercholesterolémických pacientů než u kontrolní skupiny, tento rozdíl není statisticky významný.

Tato práce vznikla s podporou projektu Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu ČR č. CZ.1.07/2.3.00/20.0040.

JAK JE TO SKUTEČNĚ SE ZVÝŠENÝMI HODNOTAMI CELKOVÉ KREATINKINASY A JEJÍCH ISOENZYMŮ PŘI ROZUMNÉ STATINOVÉ LÉČBĚ HYPERCHOLESTEROLEMIÍ?

J. Hyánek, H. Benáková, L. Kotačková, L. Dubská, H. Pejznochová, L. Fajkusová, P. Zapletalová, J. Privarová

ÚBLD VFN Praha, CMBGT FN Brno, OKBHI NNH Metabolická ambulance, Praha

Cíl

Identifikovat skutečný výskyt zvýšených hodnot celkové kreatinkinasy (CK) a jejich isoenzymů v průběhu statinové léčby u pacientů s heterozygotní formou familiární hypercholesterolemie (FH), v metabolické ambulanci NNHa dosáhnout na její diferenciaci.

Soubor pacientů

1000 dospělých pacientů-rodíčů a prarodičů nebo blízkých příbuzných dětských a adolescentních pacientů s molekulárně geneticky prokázanou FH nebo splňující metabolická kritéria těchto onemocnění podle MedPed z evidence metabolické ambulance NNH za posledních 15 let. Medikamentosní léčba vedena podáváním simva-, atorva- a rosuvastatinu v průměrné dávce 20 mg/d (jen výjimečně 60 mg) společně s ezetimibem. Při nahlášení jakékoliv myalgie léčbu přerušujeme.

Metody vyšetření

Klasické lipidové spektrum [celkový cholesterol, LDL-Ch, HDL-Ch, TAG, Apo A1, Apo B, Lp(a)] doplněné o molekulárně genetické vyšetření mutací LDL-receptorů prováděné laskavostí MedPed. Elektroforetické vyšetření isoenzymů CK provedeno na agarosovém gelovém nosiči setem Hydragel 15 ISO-CK (Sebia). Usilujeme o další identifikace makrokomplexu CK a to imunofixací s IgG, IgA, IgM, Kappa a Lambda (rozlišení komplexu isoenzymu CK a imunoglobulinu od makroglobulinu CK); studie pokračuje.

Výběr pacientů

Pro speciální vyšetření byl pacient vybrán, pokud hodnoty celkové CK přetrvávaly nejméně u dvou po půlroce opakovaných vyšetření na 3 násobku průměrných referenčních hodnot celkové CK, tj. $> 6-9$ ukat/l. Molekulárně genetické vyšetření pacientů na kausální myopatickou mutaci (SLCO1B1) nebylo u těchto vybraných pacientů zatím možno v zahraničí provést.

Výsledky

Pomocí klinických a anamnestických údajů pacienta a vyloučení arteficiálních spoluzvýšení AST, ALT, LDH či myoglobinu, bylo z celkového souboru zachyceno 62 pozitivních vzorků (6,2 %); z nich pro další vyšetření bylo použitelných jen 42 vzorků a skoro polovina vyžadovala před analýzou naředění. Podle očekávání v elektroforetickém nálezu dominovala u všech pacientů MM isoforma. MB isoforma nalezena v koncentraci nepřesahující referenční hodnoty evropské populace ($< 3,0$ %) nalezena v 52 %; makroforma CK nepřesahující referenční hodnoty ($< 3,0$ %) přítomna ve 20 %, ale pouze u 1 pacienta převyšovala normu; u 1 pacienta nalezena zvýšená isoforma BB. Myalgie zaznamenána celkem u 12 pacientů bez ohledu na CK, nejčastěji však po prostudování příbalového letáku.

Anamnestické, klinické i laboratorní údaje dovolují konstatovat tuto četnost zvýšených hodnot celkové CK u našich pacientů v pořadí: 1. cvičení, svalová námaha, úrazy, i.m. injekce (75 %); 2. neurodegenerativní a svalová onemocnění, DM I, hypothyreosa, vzácné DMP

(10 %); 3. chřipková onemocnění „celého těla a svalů“ (5 %); 4. idiopatické (dědičné) - makroformy (5 %); 5. podání jakéhokoliv statinu v dávce > 10 mg a hlavně jeho interakce s jinými léky (5 %). Následují vybrané typické kasuistiky.

Diskuse a závěr

Nalezené % zastoupení pacientů se zvýšenou hladinou CK je nepatrně nižší než údaje zahraničních autorů. Uvážlivé podávání statinů není vůbec nejčastější příčinou zvýšení hodnot CK podle našich zkušeností. Vyšetření CK před nasazením uvážené statinové léčby je obvykle začátkem hledání jiných příčin jejího zvýšení. Mírné zvýšené hodnoty CK nejsou důvodem odmítnutí statinové léčby. Její škodlivý účinek je při kombinované léčbě přeceňován a v neodborné (internetové) literatuře ke škodě pacientů zveličován.

Musí být proto dostupná imunoelektroforetická vyšetření, která neškodnou makroformu CK vysvětlí aby léčba statiny nemusela být u FH přerušována.

PREVENTIVNÍ A LÉČEBNÁ NUTRIČNÍ DOPORUČENÍ PŘI METABOLICKÉM SYNDROMU

PREVENTIVE AND THERAPEUTIC NUTRITIONAL GUIDELINES IN METABOLIC SYNDROME

D. Chrpová^{1,2}, J. Hajšlová¹, J. Pánek¹

^{1/} Ústav analýzy potravin a výživy VŠCHT Praha; ^{2/} VOŠZ a SZŠ 5. května, Praha 4

Základní podmínkou pro diagnózu metabolického syndromu je přítomnost abdominální obezity, která je spojena s vyšším obvodem v pase, jenž je definován různě pro různá etnika (v Evropě a USA je to u mužů více než 94 cm, u žen více než 80 cm). Dále je nutná přítomnost alespoň dvou ze čtyř následujících ukazatelů: hodnota triglyceridémie větší než 1,7 mmol/l, krevní tlak vyšší než 130/85 mm rtuťového sloupce nebo léčená hypertenze, glykemie nalačno vyšší než 5,6 mmol/l nebo glykemie vyšší než 7,8 – 11 mmol/l ve 2. hodině orálního glukózo tolerančního testu, a konečně dále nižší než 1,1 mmol/l hodnota HDL – cholesterolu v krvi u žen či nižší než 0,9 mmol/l téhož ukazatele u mužů. Taková je nejnovější definice metabolického syndromu Evropské a Americké diabetologické společnosti z roku 2005. Z výše uvedeného je patrné, že metabolický syndrom zasahuje do několika oblastí léčebné terapie, dietoterapii nevyjímaje. Jedná se o kombinaci nutričních doporučení pro jedince s centrálním typem obezity, pacienta s určitou formou poruchy lipidového metabolismu, pacienta s poruchou glukózové tolerance a až diabetika 2. typu či pacienta s hypertenzí. Dále se mohou objevit i další patofyziologie jako je např. hyperurikémie, která rovněž ovlivní celkové nutriční doporučení pro pacienta. Metabolický syndrom je hlavním rizikovým faktorem aterosklerózy se všemi jejími projevy a komplikacemi, proto nutriční doporučení musí mít celkový protiatrogenní charakter.

Nutriční preventivní a léčebná doporučení:

1. udržovat si alespoň relativní optimální hmotnost s ohledem na věk a fyzickou aktivitu; při nadváze či obezitě hmotnost redukovat (vhodnou redukční dietou v kombinaci s pohybovou aktivitou zohledňující zdravotní stav a fyzické možnosti jedince). I 5 – 10% snížení nadbytečné hmotnosti má pozitivní vliv na snížení rizik metabolického syndromu; pravidelnou fyzickou aktivitu zařazovat i při správné hmotnosti – mimo snížení jiných rizik metabolického syndromu, podporuje tato pravidelná aktivita i zvýšení HDL – cholesterolu v krvi.
2. pravidelný denní režim minimálně se třemi, lépe s pěti někdy i se šesti jídlý denně (dle zdravotního stavu (např. u diabetiků záleží na typu farmakoterapie) - a zvyklostí jedince)
3. individuálně, dle zdravotního stavu, dodržovat energetický trojpoměr živin, tedy cca 12 – 15 – 20 % bílkovin (cca ½ živočišných, ½ rostlinných; u pacientů s hyperurikémií vyloučit či silně omezit potraviny s vysokým obsahem purinových látek - omezit maso, vyloučit masové vývary, mořské plody, atd.); 25 – 30 – 35 % tuků s převahou nenasycených tuků; 45 – 55 – 58 % sacharidů s cca pouze 10 % celkové energie hrazené z cukrů
4. dostatečný příjem vlákniny hlavně ze zeleniny a ovoce – doporučení těchto dvou komodit v souvislosti s pozitivním efektem mimo jiné i při hypertenzi je 0,5 – 1 kg za den! (2/3 zeleniny + 1/3 ovoce), dále z celozrnných obilovin a výrobků s celozrnnou moukou, luštěnin, ořechů a brambor. Denní příjem vlákniny by měl být cca 25 g, některá doporučení jsou 20 g vlákniny/1000 kcal, tzn. při cca energetickém příjmu 8000 kJ je to cca 40 g vlákniny!

5. příjem soli kuchyňské udržovat v rozmezí kolem 5 – 8 g za den, u pacientů s hypertenzí toto množství snížit na či případně pod dolní mez (nepřisolovat, nekonzumovat průmyslově vyráběné potraviny – prakticky ve všech je nadměrné množství soli, dále jsou nevhodné uzeniny, tvrdé a tavené sýry, minerálky s vysokou koncentrací sodíku; slanou chuť je vhodné nahrazovat bylinkami, kořením, houbami, atd.)
6. silné omezení konzumace alkoholu hlavně platí pro hypertoniky
7. dbát na dostatečný příjem mléčných výrobků – spíše nižší tučnosti z důvodu dobře využitelného vápníku a možnosti ovlivnění hypertenze
8. zvýšit příjem přirozených antioxidantů nejen zvýšeným příjmem zeleniny a ovoce, ale i bylinkami a kořením (*Lamiaceae* – hlavně oregano, saturejka, tymián, máta, meduňka, šalvěj, majoránka) a dále pitím zeleného čaje
9. strava by měla být lehce stravitelná, je možné a i výhodné pokrmy připravovat šetřící technologií ve smyslu, že čerstvý tuk – nejlépe kvalitní jednodruhový olej, se přidává až do hotového pokrmu – tuk se nepřepálí a lépe lze sledovat jeho množství
10. cholesterol přijímat do množství 300 mg za den, v odůvodněných případech na množství menší – cca do 200 mg za den
11. důležité postavení v dietoterapii metabolického syndromu má nejen množství přijímaných tuků, ale hlavně jejich složení a kvalita. Z níže uvedeného rozboru jednotlivých mastných kyselin je patrné, že by nenasycený tuk měl tvořit 2/3 celkového přijímaného tuku, tj. hlavně oleje olivový, řepkový, slunečnicový a sojový kromě oleje palmového a palmojadrového; a samozřejmě ryby, především mořské a i margaríny; 1/3 by měla náležet tuku nasycenému (tuk mléka a mléčných výrobků, máslo, tuk masa a masných výrobků, včetně tuku kokosového a palmového. Z toho vyplývá, že mléčné výrobky by se měly konzumovat spíše polo až nízkotučné, uzeniny vzhledem k vysokému obsahu tuku a soli minimálně a maso upřednostňovat libové. Cukrárenské a pekárenské výrobky nejsou vhodné pro vysoký obsah nasyceného tuku a případně tuku transnenasyceného.

Složení mastných kyselin v tucích

Již dlouho je známo, že jednotlivé typy v potravě přijímaných mastných kyselin výrazně ovlivňují rozpustnost plasmatických lipoproteinů (zejména LDL) a tím ovlivňují rozvoj a průběh aterosklerotických změn v organismu. Vliv mastných kyselin (MK) na rozpustnost LD lipoproteinů lze ve stručnosti shrnout takto:

- Nasycené MK s krátkým řetězcem – do 8, částečně i 10 atomů uhlíku (obsažené např. v másle, v menším množství v kokosovém tuku; ve větším množství v tzv. MCT tucích) - neutrální vliv – nejsou součástí plasmatických lipoproteinů, v játrech jsou metabolizovány β -oxidací;
- Nasycené MK s delším řetězcem - SFA (nejvýznamnější je palmitová kyselina; jsou obsažené ve všech tucích; větší množství je v živočišných tucích, ale i v palmovém, kokosovém nebo palmojadrovém tuku) snižují rozpustnost LDL – aterogenní efekt
- Monoenové kyseliny - MUFA (v konfiguraci *cis*; zdaleka nejvýznamnější je olejová kyselina; je obsažená ve všech tucích a olejích; velké množství je hlavně v olivovém, částečně i řepkovém a dalších olejích) - neutrální vliv na rozpustnost LDL
- Polyenové kyseliny - PUFA (v konfiguraci *cis*; obsažené ve všech rostlinných olejích, hlavně ve slunečnicovém, řepkovém, sójovém, lněném aj., významný zdroj je tuk ryb) – pozitivní vliv na rozpustnost LDL
- Monoenové a polyenové kyseliny v konfiguraci *trans*: Přirozeně jsou obsaženy v mléčném tuku (do 10 %); obsah v margarínech je (na rozdíl od dřívějších) velmi nízký (obvykle okolo 1 %); větší množství lze i v současné době někdy najít v náplních a polevách některých cukrářských výrobků a částečně i ve smažicích tucích. Tato konfigurace dvojně

vazby dává nenasyceným mastným kyselinám fyzikální vlastnosti nasycených kyselin s dlouhým řetězcem, a proto jsou tyto kyseliny aterogenní. Hygienický limit není stanoven, obvykle se doporučuje, že by příjem neměl přesáhnout 5 gramů na den. V případě metabolického syndromu je ale nutno toto doporučení ještě výrazně korigovat a doporučit nejlépe úplnou restrikcí potenciálních zdrojů *trans* kyselin.

Výživová doporučení pro příjem jednotlivých typů tuků se obvykle uvádějí takto (v hmotnostních jednotkách): SFA : MUFA : PUFA 1 : 2 : 1. Restrikce jednoho typu mastných kyselin je prakticky nemožná, protože přirozené zdroje obsahují všechny typy MK v různém poměru – viz tab. I.

Tabulka I Obsah jednotlivých typů mastných kyselin v nejdůležitějších jedlých tucích (% z veškerých mastných kyselin; Pánek a kol. 2002, Velíšek, Hajšlová 2009)

Jedlý tuk	Nasycené kyseliny	Monoenové kyseliny	Polyenové kyseliny
Máslo	62	35	3
Sádlo vepřové	40	55	5
Sójový olej	15	25	60
Slunečnicový olej	12	20	68
Řepkový olej	6	64	30
Olivový olej	8 - 26	70	4 - 22
Margarin	20 - 25	20 - 40	30 - 50
Pokrmový tuk	25 - 55	30 - 50	5 - 10

Se stupněm nenasycenosti mastných kyselin klesá bod tání tuků (pevné tuky, kapalné oleje) a roste polarita (a tím i rozpustnost ve vodě, resp. krevní plasmě). Na druhé straně ale roste jejich náchylnost k oxidačnímu žluktutí. Všechny tyto aspekty je potom nutno vzít v úvahu při rozhodování, jaký tuk použít pro přípravu pokrmů.

U příjmu polyenových kyselin hraje ještě důležitou roli uspořádání dvojných vazeb v molekule. Z polyenových MK vzniká v organismu řadou metabolických pochodů (tzv. kaskáda arachidonové a eikosapentaenové kyseliny) skupina sloučenin zvaných eikosanoidy. Tyto tzv. tkáňové hormony mají řadu biologických funkcí, kromě jiného jsou mediátory zánětlivých reakcí. Odlišnou strukturu a biologickou funkci potom mají eikosanoidy vznikající z $n - 6$ ($\omega - 6$) kyselin (linolová, γ -linolenová, arachidonová) a z $n - 3$ ($\omega - 3$) kyselin (linolenová, stearidonová, eikosapentaenová EPA, dokosahexaenová DHA aj.). Kyseliny s uspořádáním $n - 6$ (slunečnicový, podzemnicový aj. oleje) tvoří prozánětlivé eikosanoidy (leukotrieny, prostaglandiny), zatímco $n - 3$ kyseliny (hlavně z rybích tuků, částečně i z řepkového, sojového a případně lněného oleje) tvoří protizánětlivé eikosanoidy. Optimální poměr příjmu $n - 6$ a $n - 3$ kyselin se odhaduje na 2-5 : 1, příjem v ČR je nepříznivý v poměru (odhadovaný) 5 - 10 : 1 (možná i více). Vysoký obsah $n - 3$ kyselin je v mořských rybách, obsah ve sladkovodních rybách je výrazně (řádově) nižší.

Mastné kyseliny se obvykle stanovují po izolaci tuku, následném zmýdelnění a převedení na methylestery plynovou chromatografií obvykle s plamenovou ionizační detekcí (GC-FID). Konfirmace identity se pak provádí pomocí hmotnostně spektrometrického detektoru (GC-MS). Tato standardní a přesná metoda používaná již desítky let má několik nevýhod:

- Je poměrně pracná, příprava vzorku k analýze trvá několik hodin;
- Pro dobrou separaci a eluci mastných kyselin, včetně isomerů je nutnou použít dlouhou kapilární chromatografickou kolonu, což v případě, že se eluuje i DHA prodlužuje dobu jedné analýzy až na dvě hodiny;

Velmi rychlou analytickou alternativou je použití přímé vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HR-MS) v otevřeném prostoru s iontovým zdrojem DART. Metoda umožňuje po izolaci tuku během několika minut získat spektrum triacylglycerolů obsažených v tuku a identifikovat triacylglyceroly obsahující sledované významné mastné kyseliny.

Oxidované tuky a jejich vliv na rozvoj metabolického syndromu

K oxidaci tuků dochází jednak při jejich dlouhodobém skladování, hlavně ale při jejich zahřívání na vysoké teploty, např. při smažení. Smažení a zejména fritování se stalo v posledních pěti desetiletích ve vyspělých zemích velmi oblíbeným způsobem přípravy pokrmů. Hlavním důvodem je zřejmě snadný a rychlý proces, kdy i méně zkušený a méně zručný kuchař dokáže připravit pokrm s výbornou senzoričkou jakostí a odpovídající hygienickou kvalitou. V Česku je výrazné zvýšení příjmu smažených pokrmů spojeno hlavně s obrovským rozmachem restaurací rychlého občerstvení (fast-food), ve kterých jsou smažené pokrmy hlavní položkou nabízeného sortimentu.

Zvýšený příjem smažených pokrmů s sebou přináší několik potenciálních výživových rizik: a) zvýšený příjem tuků, jejichž kvalita není vždy optimální; b) zvýšený příjem chloridu sodného (část spotřebitelů solí smažené pokrmy poněkud více než pokrmy ostatní); c) příjem látek, které vznikají při reakcích samotného tuku nebo reakcích degradačních produktů tuku se smaženou potravinou.

Těkavé reakční produkty se do smažené potraviny dostávají v minimálním množství a pro konzumenta nepředstavují významné zdravotní riziko. V určitých případech ale mohou být rizikové pro obsluhu. Netěkavé reakční produkty (aldehydy, oxokarboxylové kyseliny, oxidované polymery, oxysteroly aj.) zůstávají částečně ve smažicím mediu, částečně jsou ale inkorporovány do smažené potraviny (spolu s nedegradovaným tukem) a v některých případech mohou představovat zdravotní riziko pro konzumenta. U řady těchto látek byl prokázán mutagenní efekt, aterogenita, prozánětlivé působení a řada dalších negativních efektů. Tyto látky nejsou obvykle spotřebiteli vnímány jako vysoce rizikové, protože akutní toxicita je většinou nízká. Problémem je ale dlouhodobý zvýšený příjem podlimitních množství těchto sloučenin v případě časté konzumace smažených potravin. Kromě toho mohou být smažené potraviny významným zdrojem karcinogenního akrylamidu.

Negativní důsledky častější konzumace smažených potravin lze alespoň částečně eliminovat výběrem vhodného tuku, dodržováním vhodných podmínek smažení – teplota, ošetření smažené potraviny a dostatečným příjmem zeleniny. Přesto, v případě zdravého člověka se doporučuje přijímat smažené potraviny jen občas (některá doporučení uvádějí nejvýše 2x týdně). V případě rozvinutého metabolického syndromu by měl být tento příjem již zcela výjimečný.

Analytika oxidačních produktů v tepelně namáhaných tucích a olejích je poměrně komplikovaná. Tradiční analytické metody (stanovení peroxidového čísla aj.) v tomto případě zcela selhávají. Metoda stanovení polymerů pomocí vysokoúčinné vylučovací chromatografie (HP-SEC) je poměrně spolehlivá, ale stanovuje se pouze jeden typ produktu, který je navíc v organismu prakticky inertní a jehož zdravotní význam je tudíž jen okrajový. Použít lze i standardní metodu IUPAC založenou na kolonové rozdělovací chromatografii. Separace probíhá na základě odlišné polaritě neutrálních a oxidovaných triacylglycerolů. Metoda dává dobré výsledky, ale je velmi pracná, časově náročná a zcela nerobustní.

Řešením opět může být použití výše uvedené metody DART / HR – MS, kdy lze na základě rozdílné molekulové hmotnosti jednoznačně odlišit oxidované lipidy a steroly od neutrálních. Stejně jako v předchozím případě se doba analýzy (po izolaci tuku) pohybuje v minutách.

Literatura

BARRIUSO B., OTAEGUI-ARRAZOLA A., MENÉNDEZ-CARREÑO M., et al. Sterols heating: Degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. *Food Chem* 2012; 135: 706-712.

DUNOVSKÁ L., ČAJKA T., HAJŠLOVÁ J., HOLADOVÁ K. Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2006; 578: 234–240.

HAIŠLOVÁ J., VÁCLAVÍK L., HRBEK V., KOCOUREK V. Metoda pro detekci rostlinných olejů v mléčných výrobcích (Method for detection of plant oils in dairy products). Certifikovaná metodika. Praha, VŠCHT 2012.

KAMAL-ELDIN A., APPELQVIST L-A. Aldehydic acid in frying oils: formation, toxicological significance and analysis. *Grasas y Aceites* 1996; 47: 342-348.

PÁNEK J., POKORNÝ J., DOSTÁLOVÁ J., KOHOUT P. *Základy výživy*. Praha, Svoboda Servis 2002.

SVAČINA Š., MULLEROVÁ D., BRETŠNAJDROVÁ A. *Dietologie*. Praha, Triton, 2012.

VÁCLAVÍK L., BĚLKOVÁ B., RÉBLOVÁ Z., et al. Rapid monitoring of heat-accelerated reactions in vegetable oils using direct analysis in real time ionization coupled with high resolution mass spectrometry. *Food Chem* 2013; 138: 2312–2320.

VELASCO J., MARMESAT S., MARQUEZ-RUIZ G., DOBARGANES MC. Formation of short-chain glycerol-bound oxidation products and oxidised monomeric triacylglycerols during deep-frying and occurrence in used frying fats. *Eur J Lipid Sci Technol* 2004; 106: 728-735.

VELÍŠEK J., HAIŠLOVÁ J. *Chemie potravin*. Tábor, Osis 2009.

FACTORS INFLUENCING THE METHYLATION PROCESS (HOMOCYSTEINE) AND CREATINE SUPPLEMENTATION

E. Kohlíková¹, M. Petr¹, M. Štefl¹, T. Navrátil²

¹ Department of Physiology and Biochemistry, Faculty of Physical Education and Sport, Charles University, ² Heyrovský Institute of Physical Chemistry of AS CR

Abstract

It is assumed that single nucleotide polymorphisms in genes encoding enzymes involved in methylation processes influencing plasma homocysteine levels. The most significant influence on Hcy levels was found in the MTHFR 677C/T (2). The 677C>T variant which leads to the substitution of Ala-222 by valine produces MTHFR enzyme with reduced activity, resulting in an elevation of serum Hcy concentration of about 20 %. In the previous article we presented that one month administration of creatine (CR) led to a reciprocal decrease or increase not only B12 and CH3THF. Genomic DNA was isolated from buccal cells. Methodology for the MTHFR polymorphism is described in Petr (16). 30-day creatine supplementation resulted in the proband with the TT genotype to drop its resting hyperhomocysteinemia to physiological values. In other probands with genotype CC respectively. CT homocysteine levels increased only slightly and insignificantly. Biochemical processes "methylation cycle" are routed creatine supplementation in relation to changes in the genotype of MTHFR 677C / T (12,13,14,15,16).

In the previous article we presented that one month administration of creatine (CR) led to a reciprocal decrease or increase not only B12 and CH3THF. The probands were divided according to changes in the levels of vitamin B12 and folate supplementation of creatine into 4 groups - A, B, C and D. The men in group A can be characterized by an almost complete utilization of CR. Their elevated levels for folates and of Hcy and decreased level of B12 suggest that the administered CR suppressed the formation of methionine by methionine synthase and supported the utilization of vitamin B12 for processing of methylmalonyl-CoA to propionyl-CoA and further to succinyl-CoA (14,15,16). In group B consisted of only one man with the highest values of both vitamins after CR supplementation. Men in group C excreted more CR into urine than did men in group A, but had lower levels of Hcy and CH3THF and increased levels of B12. All men in group C had similar increase of Hcy and different decrease of CH3THF. Group D was characterized individually increase levels of B12 which was monitored by the rise of Hcy (14,15,16). The man, with accidentally discovered hyperhomocysteinemia, the CR administration caused a small decrease of CR, accompanied by the highest increase of vitamin B12 level, the highest decrease of Hcy level (14,15,16). The serum concentration of Hcy is positively associated with the risk of ischemic heart disease, deep vein thrombosis and pulmonary embolism, and stroke (1,3,4). For the methylation pathways to form methionine from Hcy must participate vitamin B12 and folate (11). Reactions are catalyzed by the enzyme methionine synthase (MTR) and deficiencies of these vitamins or enzyme can result in elevated plasma Hcy concentrations (5). One can assume that single nucleotide polymorphisms in genes coding enzymes involved in this pathway has the same effect (3). The most profound effect on Hcy levels in blood was found in MTHFR 677C/T (2). The 677C>T variant which leads to the substitution of Ala-222 by valine produces MTHFR enzyme with reduced activity, resulting in an elevation of serum Hcy concentration of about 20 % (5). The aim of the present analysis is to evaluate homocysteinemia following CR supplementation and relation to MTHFR genotype.

This is a secondary analysis of data from men – athletes - Causasian participating in our previous study (14,15) who provided DNA from buccal cells. All signed informed consent approved by the Ethics Committee of the Faculty. *Biochemical analysis:* Fasting blood and urine samples were collected at baseline and the next morning after completion 30-day CS supplementation and further analyzed for several metabolites including Hcy as described previously (14,15,16). *Genotyping:* Genomic DNA was isolated from buccal cells. Methodology for the MTHFR polymorphism is described in Petr et al. (16).

We evaluated the incidence of MTHFR polymorphisms and 677CC, CT and TT. For the final evaluation, we could use the 10 probands from the original study. Nine of them combined 677CC + CT, only one combination 677TT. For men with a combination 677CC + CT, plasma Hcy levels before using creatine ranged in normal and creatine supplementation alone did not lead to significant changes in Hcy. There was rather a slight but insignificant rise.

Proband with 677TT polymorphism was resting hyperhomocysteinemia and after creatine supplementation decreased Hcy to normal values.

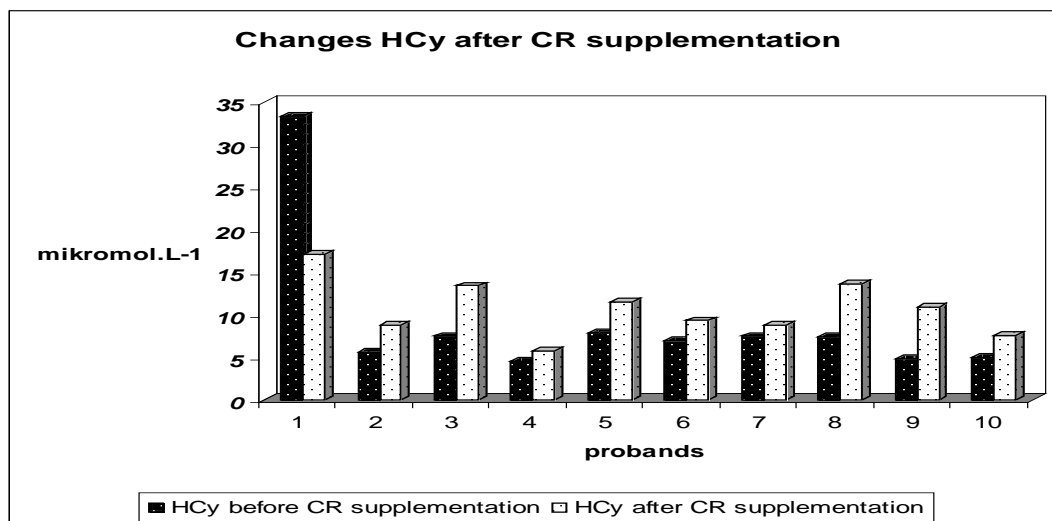
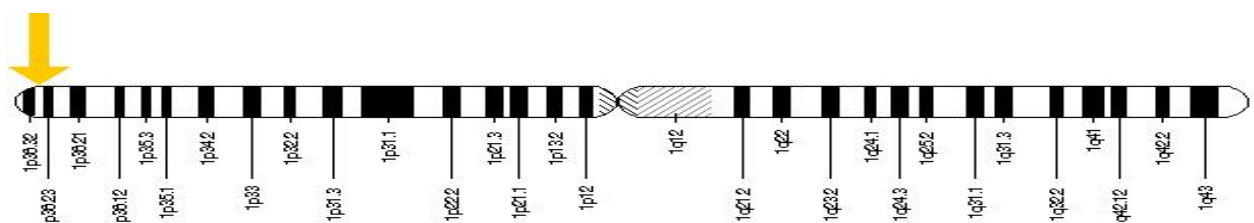


Table 1. Changes Hcy after creatine supplementation

Hcy is generated by cleavage essential methionine (Met) of protein in “methionine cycle” (8,12). Hyperhomocysteinemia may be derived f.e. from nutritional deficiency of B vitamins, or congenital deficiency MTHFR. The gene encoding MTHFR in humans is located at 1p36.3 (short arm – p of chromosome 1 position 36.3 (10).

Figure 1. Cytogenetic Location: 1p36.3 Molecular Location on chromosome 1: base pairs 11,845,786 to 11,866,159 - <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR> (20)



MTHFR 677T polymorphism occurs in the Caucasian population at 34-45 % in heterozygous and in 10-15 % in a homozygous form (7,17). Our study shows that individuals with genotype

MTHFR 677C/T polymorphism who had declined hyperhomocysteinemia, significantly reduced the 30-day administration of CR to physiological levels of HCy. Our men with CC and CT genotypes had HCy concentration before CR supplementation in normal ranges with milder individual differences (14). The only man of TT genotype had elevated HCy and after 30-day CR supplementation significantly decreased HCy to the norm. For athletes with genotype CC and CT contrary, administration of creatine insignificantly increased plasma HCy levels. As a substrate and donor of methyl groups used exclusively 5-MTHF prepared THF is present in all tissues (MTHFR) (B2-dependent), which is an important link metabolism Met a one-C residues (19) Its major gene mutation C677T and A1298G cause thermal instability enzyme impair binding to a coenzyme, reduce its activity, increasing the levels of tHCy levels homozygotes TT and thus leading cause mild hyperhomocysteinemia. (12). Creatine is formed by the combination of arginine and glycine, which produce guanidinoacetate. A methyl group from SAM is then transferred, resulting in the formation of creatine. The byproduct of this reaction, S-adenosylhomocysteine, is subsequently hydrolyzed into homocysteine and adenosine (6,9,18).

MTHFR gene encodes an enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), which is responsible for methylation of homocysteine to methionine amino acid. Polymorphisms in this gene, particularly 677C > T, leading to the formation thermolabile enzyme with lower activity. Homozygotes (TT) for this mutation, may have elevated levels of homocysteine, which is an independent risk factor for atherosclerosis. While polymorphisms 677CC + CT at our men exhibit normal or only slightly elevated plasma homocysteine in the proband with the 677TT genotype was a significant hyperhomocysteinemia. The subsequent 30-day creatine supplementation was observed only in the proband significant decrease in plasma homocysteine to normal levels. The other observed genotypes with this level only slightly and insignificantly increased.

References

1. BAILEY LB., DUHANEY RL., MANEVAL DR., et al. Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr* 2002; 132: 1872–1878.
2. BARBOSA PR., STABLER SP., TRENTIN R., et al. Evaluation of nutritional and genetic determinants of total homocysteine, methylmalonic acid and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine values in Brazilian childbearing-age women. *Clin Chim Acta* 2008; 388: 139-147.
3. BARIC I., FUMIC K., GLENN B., et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4234-4239.
4. BUDY B., O'NEILL R., DIBELLO PM., et al. Homocysteine transport by human aortic endothelial cells: identification and properties of import systems. *Arch Biochem Biophys* 2006; 446: 119–130.
5. BRATTSTRÖM L., WILCKEN DE., OHRVIK J., BRUDIN L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998; 98: 2520-2526.
6. CHANGO A., BOISSON F., QUILLIOT D., et al. The effect of 677CT and 1298AC mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr* 2000; 83: 593-596.
7. CHRISTENSEN B., FROSST P., LUSSIER-CACAN S., et al. Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 569-573.

8. DUBSKÁ L., HYÁNEK J. Stanovení homocysteinu v biologickém materiálu. *Klin Biochem Metab* 2009; 17(38): 93-95.
9. GELLEKINK H., den HEIJER M., HEIL SG., BLOM HJ. Genetic determinants of plasma total homocysteine. *Semin Vasc Med* 2005; 5: 98-109.
10. GOYETTE P., SUMNER JS., MILOS R., et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994; 7: 195-200.
11. HERBERT V. Folic acid. In: *Modern nutrition in health and disease*. M.E. Shils, et al. ed. 9th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1999, 433-446.
12. HYÁNEK J., DUBSKÁ L., PEJZNOCHOVÁ H., et al. Hyperhomocysteinemie – nepoznané, nepoznatelné a zanedbané (homocystein – užitečný marker methylačních poruch z deficitu holotranskobalaminu a folatu). *Klin Biochem Metab* 2009; 17(38): 83–92.
13. IVANOV A., NASH-BARBOZA S., HINKIS S., et al. Genetic variants in phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase (PEMT) and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD1) influence biomarkers of choline metabolism when folate intake is restricted. *J Am Diet Assoc* 2009; 109: 313–318.
14. NAVRÁTIL T., KOHLÍKOVÁ E., PETR M., et al. Supplemented creatine induces changes in human metabolism of thiocompounds and one- and two-carbon units. *Physiol Res* 2010; 59: 431-442.
15. NAVRÁTIL T., PETR M., SENHOLDOVÁ Z., et al. Diagnostic significance of urinary thiodiglycolic acid as a possible tool for studying the role of vitamins B12 and folates in the metabolism of thiolic substances. *Physiol Res* 2007; 56: 113-122.
16. PETR M., STEFFL M., KOHLÍKOVÁ E. Effect of the MTHFR 677C/T polymorphism on homocysteinemia in response to creatine supplementation: a case study. *Physiol Res* 2013 Jul 17. [Epub ahead of print]
17. SLEZÁKOVÁ Z. Výskyt polymorfizmu C677T genu pro MTHFR v české populaci. Bakalářská práce MASARYKOVA UNIVERZITA, Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie. Brno 2011.
18. STRANDHAGEN E., ZETTERBERG H., AIRES N., et al. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is a major determinant of coffee-induced increase of plasma homocysteine: a randomized placebo controlled study. *Int J Mol Med* 2004; 13: 811–815.
19. UELAND PM., CLARKE R. Homocysteine and cardiovascular risk: considering the evidence in the context of study design, folate fortification, and statistical power. *Clin Chem* 2007; 53: 807-809.
20. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR>

Abbreviations

Ala - alanine

CR - creatine

CH₃THF - methyltetrahydrofolate

HCy - homocysteine

Met - methionine

MTHFR - methylenetetrahydrofolate reductase

MTR - methionine synthase

5-MTHF - 5-methyltetrahydrofolate

THF - tetrahydrofurans

SAM - S-adenosylmethionine

NADVÁHA, AKO AKTUÁLNY RIZIKOVÝ FAKTOR PREDČASNEJ ATEROMBÓZY V DVOCH VEKOVÝCH KATEGÓRIÁCH MLADÝCH ĽUDÍ

OVERWEIGHT AS A TOPICAL RISK FACTOR OF PREMATURE ATHERO- THROMBOSIS IN TWO AGE CATEGORIES OF YOUNG PEOPLE

J. Koprovičová

Lekárska fakulta Univerzity P.J. Šafárika, Košice, Slovenská republika

Abstract

Obesity is at present the most frequent chronic metabolic disease in the world. However overweight is mentioned less frequently in this respect. In our study we investigated serum concentration of apolipoproteins (apo B₁₀₀, apo A-I), lipids (TC, TG, non HDL-C, HDL-C) and atherogenous ratios (apo B/apo A-I, TG/HDL-CH) in N₁ = 27 overweight children in puberty (Ž) and N₂ = 23 university students (V) with overweight. We found in both groups with overweight dyslipidemia, i.e. significantly increased serum concentrations of atherogenous lipids, apolipoproteins and elevated values of atherogenous ratios. Our results of apo B₁₀₀, lipids and atherogenous ratios in children in puberty and in university students with overweight are evidence of disturbed lipid metabolism, resp. dyslipidemia and therefore they mean a strong risk of metabolic syndrome and early atherothrombosis.

Úvod

V ostatných päťdesiatich rokoch obezita sa stala globálnou epidémiou a hlavným zdravotným problémom v mnohých štátoch vyspelej Európy a sveta. Dnes je známe, že vznik obezity predurčuje komplex vzájomne súvisiacich faktorov, medzi ktoré patria najmä biologické, behaviorálne a enviromentálne faktory. Obezita aj v detskom veku znamená zvýšené riziko, keďže je potenciálnym iniciátorom mnohých ďalších ochorení v detstve ale aj v neskoršom veku dospelosti. Medzi najzávažnejšie ochorenia patria: predčasná aterotrombóza, diabetes mellitus a arteriová hypertenzia. Zistilo sa, že obezita urýchľuje aterosklerotický proces aj u detí a taktiež u mladých dospelých (Barton 2012). U detí a adolescentov obezita asociuje s predčasnou aterotrombózou a diabetes mellitus typu 2. Klinická manifestácia aterotrombózy zvyčajne začne v strednom veku, ale bolo dokázané, že jej vývoj začne oveľa skôr, ešte v detskom veku. Postprandiálna hyperlipémia u detí a mládeže bola zaradená medzi významné nezávislé rizikové faktory vzniku predčasnej aterotrombózy (Sahade et al. 2012).

Cieľ štúdie

Zistiť mieru ohrozenia jedinca z hľadiska dyslipidémie a teda aj vzniku predčasnej aterotrombózy mladých ľudí s nadváhou v dvoch vekových kategóriách: u žiakov základných škôl (Ž) v pubertálnom veku a u vysokoškolákov (V).

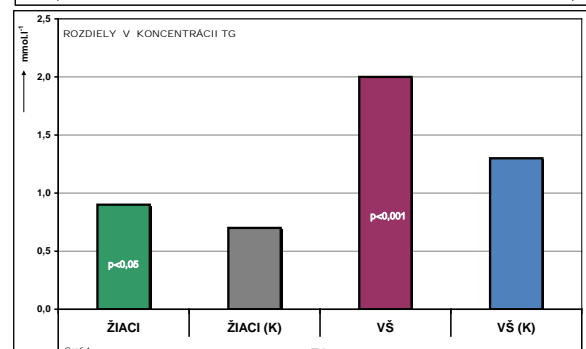
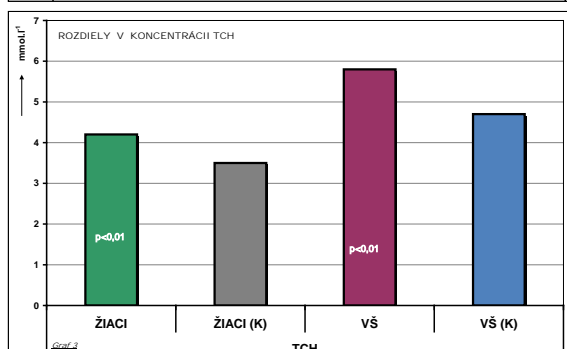
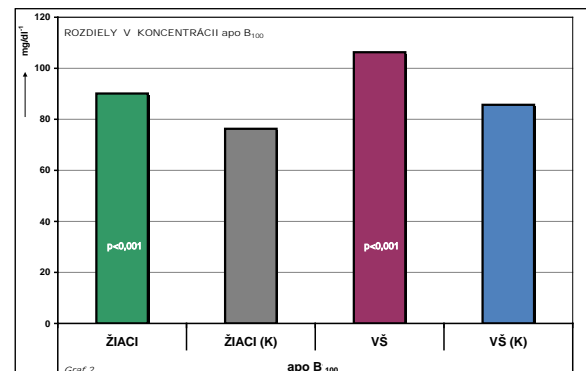
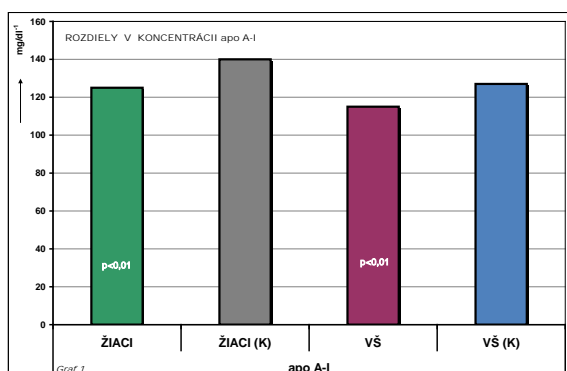
Materiál a metódy

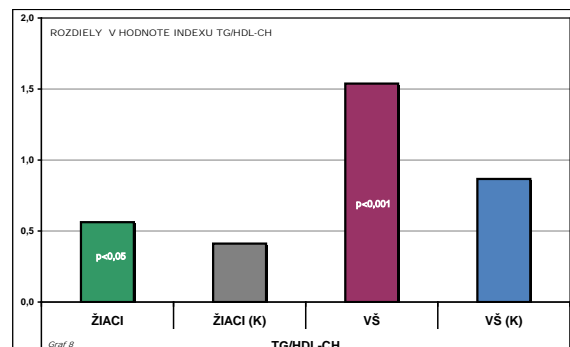
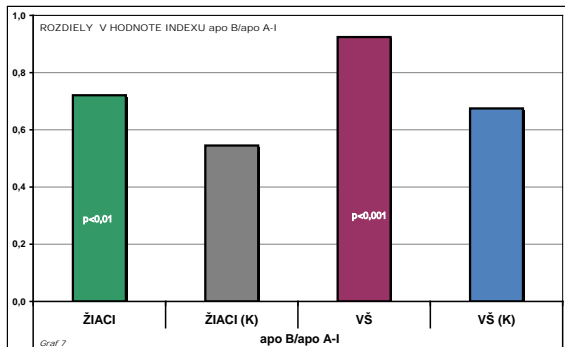
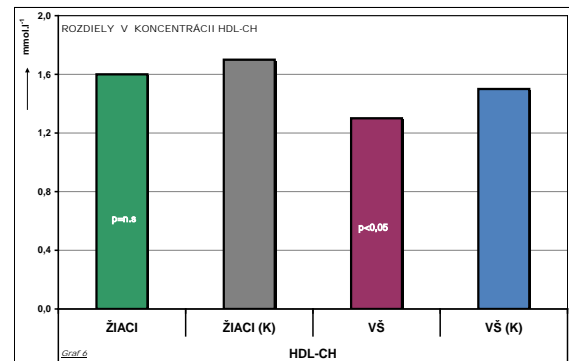
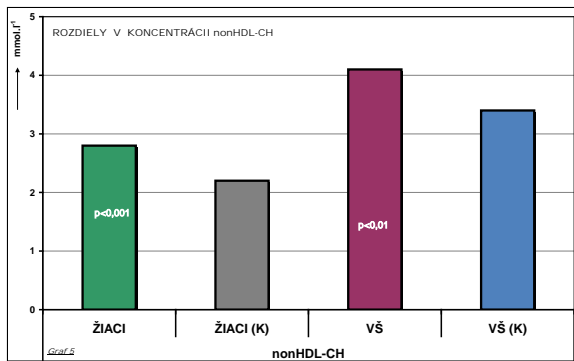
Sledovali sme sérovú koncentráciu apolipoproteínov apo A-I, apo B₁₀₀, z lipidov koncentráciu celkového cholesterolu (TCH), triacylglycerolov (TG), non HDL-cholesterolu (non HDL-CH) a HDL-cholesterolu (HDL-CH) a taktiež hodnotu aterogenných indexov apo B/apo A-I a TG/HDL-CH v skupine žiakov v puberte s nadváhou N₁ = 27 s priemerným vekom 13,5 rokov s priemernými hodnotami BMI: 27,3 kg/m² (Ž) a taktiež v skupine vysokoškolákov s nadváhou N₂ = 23 s priemerným vekom 20,5 rokov s priemernými hodnotami BMI: 27,7 kg/m² (V). Koncentráciu apo A-I sme určovali metódou radiálnej imunodifúzie (RID) a koncentráciu apo B₁₀₀ pomocou metódy elektroimunodifúzie (EIA) za použitia nemeckých

štandard a antisér (fy Behringwerke, Marburg). Koncentráciu TCH, TG a HDL-CH sme stanovovali pomocou komerčných biochemických setov českej výroby (fy Pliva_la-Chema), pričom HDL-CH sme izolovali precipitačne podľa Gidéza. Koncentráciu non HDL-CH a hodnotu aterogenných indexov apo B/apo A-I a TG/HDL-CH sme vypočítali z príslušných matematických vzorcov. Výsledky sme vyhodnotili χ^2 testom a výpočtom lineárnej regresie.

Výsledky

Priemerné sérové koncentrácie určovaných parametrov s vyznačenými hodnotami štatistickej významnosti znázorňujeme graficky (grafy 1–8). Graf 1 znázorňuje sérovú koncentráciu protektívneho apo A-I, ktorej priemerná koncentrácia bola významne znížená jednak v skupine žiakov s nadváhou (Ž), ako aj v skupine vysokoškolákov s nadváhou (V) v porovnaní s kontrolnou skupinou (K). Opačná situácia nastala v prípade aterogenného apo B₁₀₀, keďže jeho sérová koncentrácia bola významne zvýšená v skupinách (Ž) a (V) v porovnaní s kontrolnou skupinou (graf 2). Z lipidových parametrov, sérová koncentrácia TCH bola štatisticky významne zvýšená v oboch skupinách (Ž) a (V) oproti skupine (K) (graf 3). Ďalší dôležitý aterogenný lipidový parameter TG, ktorého sérová koncentrácia bola významne zvýšená v skupinách (Ž) a (V) ale s vyššou štatistickou významnosťou v skupine (V) v porovnaní s kontrolnou skupinou (graf 4). Obdobne, aj sérová koncentrácia veľmi aterogenného non HDL-CH bola signifikantne vysoko zvýšená v oboch skupinách s nadváhou (Ž) a (V) oproti skupine (K) (graf 5). S vyššie uvedenými výsledkami koreluje aj nález ohľadom koncentrácie protektívneho HDL-CH. Zistili sme totiž jeho zníženie sérovú koncentráciu ($p = n.s.$) v skupine (Ž) a signifikantne zníženie koncentráciu v skupine (V) v porovnaní s kontrolnou skupinou (graf 6). Z aterogenných indexov hodnota indexu apo B/apo A-I bola signifikantne zvýšená v oboch skupinách probandov s nadváhou (Ž) a (V) s vysokou štatistickou významnosťou oproti skupine (K) (graf 7). Napokon detegovali sme aj zvýšenú hodnotu indexu inzulinovej rezistencie TG/HDL-CH $p = n.s.$ v skupine (Ž), respektíve štatisticky významne zvýšenú jeho hodnotu v skupine (V) v porovnaní s kontrolnou skupinou (K) (graf 8).





Diskusia

Závažnosť obezity spočíva jednak v tom, že často je iniciátorom vzniku rôznych, najmä civilizačných ochorení ale aj to, že skracuje predpokladanú dĺžku života. Novinkou je zistenie, že nielen obezita, ale aj nadváha môže byť takmer rovnako nebezpečná. Zistilo sa, že nadváha je riziková nielen v dospelosti ale už aj v mladom veku a môže iniciovať vznik predčasnej aterotrombózy a taktiež nádorové ochorenia (Ceschi et al. 2007).

Podľa americkej kardiologickej spoločnosti AHA je obezita hlavným predispozičným rizikovým faktorom predčasnej aterotrombózy a kardiovaskulárnych ochorení vôbec, pričom sa uvažuje aj o nadváhe, ako o potenciálnom rizikovom faktore. Toto zistenie sa potvrdilo v mnohých epidemiologických štúdiách. V americkej štúdiu autori zistili u obéznych žien stredného veku (N = 475) až dvojnásobné zvýšenie kardiovaskulárneho rizika a u žien s nadváhou zvýšenie rizika bolo 40% (Khan et al. 2012).

Ďalšou neblahou komplikáciou obezity je metabolický syndróm (MS). Rozšírenie tohto ochorenia v súčasnosti má stúpajúci trend, keďže podľa aktuálnych štatistických údajov WHO postihuje cca jednu štvrtinu populácie v priemyselne vyspelých štátov a u 50-ročných dokonca až 40 % populácie. MS charakterizuje dyslipidémia, najmä hypertriacylglycerolémia kombinovaná so zníženou sérovou koncentráciou HDL-CH. Dyslipidémiu sme detegovali aj u našich mladých probandov v oboch vekových kategóriách (Ž) a (V). Závažnosť MS spočíva najmä v tom, že značne zvyšuje kardiovaskulárne riziko, keďže je považovaný za hlavný predispozičný rizikový faktor predčasnej aterotrombózy (Standeven a Grant 2011).

Zvýšená hodnota aterogénneho indexu TG/HDL-CH vypovedá o zvýšenej inzulínovej rezistencii. Významne zvýšenú hodnotu tohto indexu (CL50 % = 3,64; p < 0,001) v súlade s autormi španielskej štúdie u obéznych žien sme našli aj my (CL50 % = 3,51) u našich probandov s nadváhou (Roa Barrios et al. 2009, Koprovičová 2011).

Čo sa týka metabolizmu apolipoproteínov, mnohí významní lipidológovia považujú zvýšenú hodnotu indexu apo B/apo A-I z hľadiska kardiovaskulárneho rizika za aterogénnejšiu a teda aj za nezávislý marker s lepšou výpovednou hodnotou, ako je zmenená koncentrácia

jednotlivých apolipoproteínov (Enkhmaa et al. 2010). Hodnota uvedeného indexu bola signifikantne zvýšená aj u našich probandov s nadváhou.

Z výsledkov našej štúdie vyplýva, že naša mládež s nadváhou už má dyslipidémiu a taktiež aj zvýšenú hodnotu indexu inzulínovej rezistencie. Je teda ohrozená z hľadiska vzniku metabolického syndrómu a predčasnej aterosklerózy.

Záver

V štúdií odprezentované zmenené sérové koncentrácie lipidov a apolipoproteínov a taktiež zvýšené hodnoty aterogenných indexov u mladých ľudí s nadváhou sú rizikové a preto môžeme vyjadriť obavu, že takýto jedinci sú výrazne ohrození vznikom predčasnej aterosklerózy.

Literatúra

BARTON M. Childhood obesity: a life-long health risk. *Acta Pharmacol Sin* 2012; 33: 189-193.

CESHI M., GUTZWILLER F., MOCH H., et al. Epidemiology and pathophysiology of obesity as cause of cancer. *Swiss Med Wkly* 2007; 137: 50-59.

ENKHMMA B., OZTURK Z., ANUURAD E., BERGLUND L. Postprandial lipoproteins and cardiovascular disease risk in diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2010; 10: 61-69.

KHAN UI., WANG D, THURSTON RC., et al. Burden of subclinical cardiovascular disease in „Metabolically Benign“ and „AT-Risk“ overweight and obese women. The Study of Woman´s Health Across the Nation (SWAN). *Atherosclerosis* 2012; 217: 179-186.

KOPROVIČOVÁ J. Overweight in correlation with changed serum concentration of apolipoproteins as a potential risk factor of premature atherothrombosis in university students. *Atherosclerosis* 2012, Praha, 2012, 13-16.

ROA BARRIOS M., ARATA-BELLABARBA G., VALERI L., VELÁZQUEZ-MALDONADO E. 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.

SAHADE V., FRANÇA S, BADARÓ R, FERNANDO ADÁN L. Obesity and postprandial lipemia in adolescents: risk factors for cardiovascular disease. *Endocrinol Nutr* 2012; 59: 131-139.

STANDEVEN KA., GRANT PJ. Atherosclerosis and the Metabolic Syndrome. In: *The Metabolic Syndrome*. 2nd Ed. Oxford, UK, Wiley-Blackwell 2011, 34-49.

SLOŽENÍ MASTNÝCH KYSELIN U CHRONICKÉ PANKREATITIDY

J. Macáček, B. Staňková, J. Kodydková, L. Vávrová, M. Zeman, E. Tvrzická, T. Krechler, A. Žák

IV. interní klinika, 1. LF UK a VFN v Praze

Úvod

Chronická pankreatitida (ChP) je chronické, zánětlivé, trvale progredující onemocnění vedoucí k destrukci parenchymu a ke vzniku exokrinní a terminálně i endokrinní dysfunkce. I když pro ChP jsou příznačné nekrózy, chronický zánět i fibrotická náhrada tkáně pankreatu, tak fibrogenese je základním patogenetickým procesem onemocnění. V patogenezi ChP hrají roli acinární, duktální buňky i pankreatické hvězdicové buňky (PSC). PSC regulují syntézu i degradaci extracelulární tkáně a jsou odpovědné za fibrotickou přestavbu. Aktivaci PSC způsobuje acetaldehyd (metabolit etylalkoholu), lipopolysacharidy, reaktivní kyslíkové a dusíkové sloučeniny (RNOS) i prozánětlivé cytokiny [TNF- α , interleukin (IL)-1 a IL-6]. Navíc PSC secernují cytokiny a tak přispívají k vlastní autoaktivaci (Behrman a Fowler 2007, Witt et al. 2007).

Etiologie ChP je multifaktoriální. Rizikové faktory, které jsou asociovány s ChP, byly zahrnuty do současné etiologické klasifikace ChP podle TIGAR-O klasifikace. Ta dělí ChP na formu toxicko-metabolickou (resp. nutritivní) (T), idiopatickou (I), genetickou (G), autoimunitní (A), rekurentní akutní pankreatitidu (R) a obstruktivní (O) formu (Etemad a Whitcomb 2001). Incidence ChP se pohybuje mezi 3 – 9 případy /100 tis. obyvatel/rok (Gupta a Toskes 2005). Prevalence ChP se odhaduje na 27případů/100 tis obyvatel a její mortalita činí 13 do 20 %. Zhruba 20 % nemocných s ChP má známky endokrinní a exokrinní dysfunkce bez současné bolesti (Gupta a Toskes 2005). Diabetes mellitus (DM) nejčastěji provází kalcifikující ChP etylické etiologie. Bývá zjišťován až u 2/3 nemocných. Mezi komplikace ChP dále patří refrakterní bolesti, zevně sekretorická insuficience, pseudocysty, stenóza duodena, pankratogenní ascites, segmentální portální hypertenze, obstrukce žlučových cest a striktury pankreatických vývodů. Nejzávažnější komplikací je pankreatický duktální adenokarcinom (French a Charnley 2010).

Mastné kyseliny (FA) patří mezi základní stavební sloučeniny živých organismů. Poskytují důležitou zásobu energie a ovlivňují strukturu a funkce buněčných membrán. Navíc jsou substrátem pro vznik celé škály sloučenin s významnými fyziologickými účinky.

Složení FA v lipidech se díky různým podnětům v průběhu života neustále mění. Jednoduché i složené lipidy plazmy a různých tkání u lidí se vyznačují charakteristickým složením FA s měnícím se zastoupením nasycených a nenasycených FA. Člověk a ostatní savci syntetizují pouze nasycené FA (SFA) a mononenasycené FA (MFA) řady n-7 a n-9, protože u nich nejsou přítomné enzymy $\Delta 12$ a $\Delta 15$ desaturázy (přítomné u rostlin), které zajišťují vznik dvojné vazby v pozicích n-6 a n-3 u PUFA. Z tohoto důvodu musí savci získávat esenciální n-6 (linolová kyselina, LA, 18:2n-6) a n-3 (α -linolenová kyselina, ALA, 18:3n-3) PUFA z potravy. Buňky savců jsou schopné konverze PUFA v rámci každé řady pomocí enzymatické elongace, desaturace a retrokonverze zajišťované příslušnými enzymy. Po příjmu v potravě je LA metabolizována sledem oxidativních desaturací a elongací na kyselinu arachidonovou (AA; 20:4n-6). Konverze ALA na EPA a dokosaheptaenovou kyselinu (DHA, 22:6n-3) je u lidí omezená. Předpokládá se, že jen méně než 10 % z potravy ALA je konvertováno na EPA. Navíc má lidská tuková tkáň významně omezenou schopnost skladovat n-3 PUFA s dlouhým řetězcem. Proto u člověka je potřeba průběžného a dostatečného přísunu n-3 PUFA s dlouhým řetězcem v dietě. Existuje celá řada biologických účinků PUFA. PUFA obou řad, které se přednostně nacházejí v sn-2 pozici membránových

fosfolipidů, určují biofyzikální vlastnosti membrán (fluiditu, tloušťku a deformovatelnost) a ovlivňují aktivitu transmembránových proteinů (enzymů, přenašečů a receptorů). Membranové fosfolipidy slouží jako prekurzory signálních molekul jako např. diacylglyceroly, kyselina fosfatidová, inositol-1,4,5-trifosfát, ceramidy a eicosanoidy. Relativní poměr n-6 PUFA (LA, dihomogama-linolové kyseliny, DHGLA, 20:3n-6, AA) a n-3 PUFA (ALA, EPA, DHA) určuje po stěpení fosfolipázou substrátovou dostupnost pro cyclooxygenázy (COX) a lipoxigenázy (LOX), a tím i rovnováhu mezi jednotlivými eicosanoidy (pro- a protizánětlivé) a ostatními autakoidy (resolviny a neuroprotektiny). Konečně PUFA jsou i ligandy nukleárních receptorů [peroxisomálními proliferátory-aktivovaný receptor (PPAR) a X receptor pro kyselinu retinovou (RXR)], které řídí genovou expresi. Esenciální PUFA řady n-6 a n-3 jsou po desaturaci a elongaci na 20 uhlíkové molekuly metabolizovány za vzniku prostaglandinů (PG), thromboxanů (TX), hydroxyeicosatetraenových kyselin (HETE) and leukotrienů (LT) díky enzymové aktivitě COX a LOX. Eicosanoidy modulují růst buněk a jejich diferenciaci, zánětlivou aktivitu, imunitní odpověď, agregaci destiček a mají řadu dalších funkcí. Obecně lze říci, že eicosanoidy odvozené od n-6 PUFA mají prozánětlivé účinky a naproti tomu ty, které vznikají z n-3 PUFA mají účinky opačné, protizánětlivé. DHGLA je metabolizována na prostaglandiny série-1 (PGE₁, s výraznými vasodilatačními a antiagregačními účinky) a na LT série-3 (např. 15-hydroxyeicosatrienová kyselina, HETrE), které inhibují vznik leukotrienu B₄. Eicosanoidy, které vznikají z AA působením COX resp. LOX, se nazývají PG série-2 a LT série-4, působí jako mediátory zánětlivých procesů (mají prozánětlivé účinky, např. indukují bolest, horečku, vasodilataci apod.). EPA dává vznik PG série-3 a TX, které mají antiagregační účinky bez doprovodné imunosupresivní aktivity. Podobně LT série-5, deriváty EPA, mají protizánětlivé a antiagregační účinky. Kromě biologických účinků, zprostředkovaných vlastními eicosanoidy, n-3 PUFA působí ještě nepřímě tak, že inhibují syntézu eicosanoidů z n-6 PUFA. Když jsou v membránách n-6 PUFA resp. AA, nahrazeny n-3 PUFA, dojde ke kompetici desaturáz, elongáz, COX and LOX o oba substráty. Tato kompetice vede ke snížení syntézy PGE₂, TXA₂ a LTB₄. Proto je substituce n-3 PUFA doprovázena snížením agregace destiček, prodloužením srážlivosti krve a ovlivněním syntézy zánětlivých cytokinů a dalších zánětlivých a imunitních funkcí (Tvrzická et al. 2011, Kremmyda et al. 2011).

Složení FA v plasmatickém fosfatidylcholinu (PC) a esterech cholesterolu (CE) reflektuje jak příjem FA potravou v předchozích několika týdnech, tak endogenní metabolismus FA (syntéza FA *de novo*, β -oxidaci, enzymatickou desaturaci a elongaci, enzymatickou i neenzymatickou lipoperoxidaci). Změny ve složení FA byly popsány u mnoha chorobných stavů, jako je sepse, popáleniny, ARDS, ischemická choroba srdeční, hypertenze, depresivní poruchy, DM, MS a další.

Jak bylo uvedeno výše, na změnách ve složení FA u ChP se může podílem maldigestce tuků a esenciálních mastných kyselin, jejich zvýšená degradace v důsledku zvýšené úrovně zánětu, oxidačního stresu a lipoperoxidace, současně přítomná insulinová rezistence a DM, případně další faktory ovlivňující denaturaci a elongaci FA (Tvrzická et al. 2011, Kremmyda et al. 2011, Žák et al. 2007, Žák et al. 2008, Kodydková et al. 2013).

Písemnictví věnované složení FA u ChP je relativně chudé. Složení FA bylo analyzováno u myši s experimentální pankreatitidou (Weylandt et al. 2008). Klinické studie se zaměřily na sledování složení FA u etylické ChP (Marosvolgyi et al. 2010) a vliv diabetické poruchy na složení FA u ChP (Quilliot et al. 2003).

Cílem této pilotní studie proto bylo analyzovat složení FA v lipidových třídách plasmy u pacientů s ChP (i), zjistit zda se u ChP vyskytuje (sub)klinický deficit esenciálních FA (ii), případně se kterými klinickými a biochemickými odchylkami jsou změny FA u pacientů s ChP asociovány (iii).

Materiál a metody

Do prospektivní observační studie bylo zařazeno 97 pacientů (25/72:Ž/M) ambulantních a stejný počet osob (25/72:Ž/M) kontrolní skupiny párovaných podle věku a pohlaví. Diagnóza ChP byla provedena na základě klinického obrazu (bolesti břicha, dyspepsie, nechutenství, malnutrice, steatorea) potvrzeného minimálně dvěma zobrazovacími metodami (USG/ kontrastní CT; ERCP/MRCP a EUS) postupem publikovaným dříve (Kodytková et al. 2013). Do studie byli zařazeni pouze pacienti s jednoznačně potvrzenou diagnózou ChP.

Alkoholová ChP byla zjištěna u 62 pacientů, idiopatická ChP v 30 případech, obstrukční ChP 3, autoimun. a hereditární po 1 pacientovi. Mezi 97 nemocnými s ChP jsme prokázali v 66 těžký stupeň, v 14 střední stupeň ChP a 17 případů mírný stupeň ChP. Těžká exokrinní dysfunkce (koncentrace fekální elastázy < 200 ng/g) byla zjištěna u 42 pacientů. U 30 osob s ChP byl diagnostikován DM, léčený dietou (6) PAD (9) a insulinem (15). Komplikace ChP (ascites, krvácení do GIT, obstrukce/striktura ductus choledochu, pankreatické píštěle, stenóza duodena, trombóza v. portae a jejích větví a segmentální portální hypertenze) byla prokázána u 26 pacientů s ChP.

Do kontrolní skupiny byli zařazeni zdraví dobrovolníci (např. zdravotnický personál) a pacienti s degenerativními chorobami (artrózy) a pacienti s funkčními srdečními a zažívacími chorobami. Pro obě skupiny platila stejná vylučovací kritéria: léčba antioxidanty (farmakologické dávky vitamínu C a E, allopurinol, N-acetylcystein) suplementace n-3 a n-6 mastnými kyselinami, známá nefropatie (kreatinin > 150 $\mu\text{mol/l}$), manifestní proteinurie (>500 mg/l), hepatopatie, dekompenzovaný DM, endokrinopatie, akutní pankreatitida a akutní recidiva ChP, nestabilní angina pectoris, akutní IM, PTCA, revaskularizační operace (v době < 1 rok). Dále byli vyloučeni nemocní po prodělaném krvácení do GIT a systémovém zánětu (do 6 měsíců). U všech osob zařazených do studie bylo provedeno vyšetření klinické, včetně antropometrického vyšetření. Krev byla odebírána po 12-hodinovém lačnění. Odebrané krevní vzorky byly zpracovány do 30 min od náběru a plasma pro další analýzy byla uchovávána při -80°C.

Běžné laboratorní parametry byly vyšetřeny automatickými analyzátory, složení FA ve PC, CE a triacylglycerolech (TAG) bylo vyšetřeno plynovou chromatografií (Tvrzická et al. 2002).

Pro statistické analýzy byl použit program STATISTICA® 10.0 (Stat Soft, CZ). Za statisticky signifikantní byly považovány výsledky s $P < 0,05$.

Výsledky

Základní klinická a biochemická data obou skupin jsou uvedeny v tabulce 1. Rozdíly průměrů koncentrací neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK), konjugovaných dienu v LDL (CD/LDL), kyseliny močové, bilirubinu, HDL-cholesterolu (HDL-C) nebyly statisticky významné.

Tabulka 2 uvádí koncentrace relevantních FA ve třídě PC ve skupině ChP a u kontrol.

Tabulka 1 Základní klinická a biochemická data sledovaných skupin

	Chronická pankreatitida	Kontrolní soubor
Počet osob (Ž/M)	97 (25/72)	97(25/72)
Věk (roky)	56 ± 11	54 ± 11
Tělesná hmotnost (kg)	82,5 ± 34,2	85,8 ± 16,1
BMI (kg/m ²)	24,7 ± 4,8 ^{***}	28,3 ± 4,7
poměr pas/boky	1,01±0,28*	0,96±0,08
obvod pasu (cm)	91,7 ± 13,0 ^{***}	99,0 ± 12,7
STK (mm Hg)	131 ± 19	135±17
DTK (mm Hg)	80± 12 ^{**}	84± 9
Celková bílkovina (g/l)	74,5± 7,1	74,6± 3,8
Albumin (g/l)	44,9 ± 4,5 ^{**}	46,7 ± 2,7
CRP (mg/l)	3.3 (1,2 – 7,2) ^{**}	2,8 (1,0 – 4,8)
TC (mmol/l)	4,9 ± 1.2 ^{****}	6,0 ± 1.3
TG (mmol/l)	1,3 (1,0 – 1,8) ^{****}	2,0 (1,3 – 2,7)
Apo A1 (g/l)	1,56 ± 0,43 ^{**}	1,40 ± 0,23
Apo B (g/l)	0,97 ± 0,27 ^{***}	1,36 ± 0,38
Bilirubin (µmol/l)	11,3± 6,9	11,2± 4,6
tHcy (µmol/l)	15,5 (12,3-19,1) ^{****}	11,2 (9,0-14,6)
Glukosa (mmol/l)	6,4± 2,6 ^{**}	5,4± 1,7
Insulin (mIU/l)	6,6 (3,8-10,7) ^{**}	5,0 (4,6-5,6)
HOMA-IR	1,51 (0,93-3,21)	1,97 (1,27-3,11)

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SD, resp. jako medián (25. – 75. percentil, resp. IQR)
Zkratky: STK, DTK – systolický (resp. diastolický) TK; apo – apolipoprotein; TC – celkový cholesterol, TG – triglyceridy, HOMA-IR – homeostasis model assessment for insulin resistance; CRP – C-reaktivní protein;

Tabulka 2 Koncentrace relevantních mastných kyselin ve třídě fosfatidylcholinu

Mastná kyselina	Chronická pankreatitida	Kontrolní soubor
14:0	0,283 ± 0,093	0,264 ± 0,059
16:0	31,0 ± 4,4**	29,6 ± 1,5
16:1n-9	0,119 ± 0,035**	0,108 ± 0,024
16:1n-7c	0,684 (0,518-1,00) ****	0,520 (0,449-0,611)
18:0	13,9 ± 2,2	13,9 ± 1,2
18:1n-9c	12,7 ± 3,3****	9,5 ± 1,5
18:1n-7c	1,85 ± 0,43****	1,50 ± 0,26
18:2n-6cc	19,43 ± 4,0****	23,1 ± 3,1
18:3n-6alc	0,102 ± 0,056**	0,086 ± 0,037
18:3n-3alc	0,174 (0,128-0,228)	0,198 ± 0,072
20:1n-9c	0,160 ± 0,042****	0,130 ± 0,034
20:2n-6cc	0,376 (0,314-0,549)	0,359 (0,310-0,434)
20:3n-6alc	3,16 ± 0,94	3,13 ± 0,59
20:4n-6alc	10,6 ± 3,5	11,3 ± 2,0
20:5n-3alc	0,761 (0,578-1,027)**	1,1 ± 0,8
22:4n-6alc	0,356 ± 0,113****	0,300 ± 0,063
22:5n-6	0,255 (0,205-0,306)***	0,192 (0,159 0,226)
22:5n-3alc	0,919 ± 0,305	0,906 ± 0,171
22:6n-3alc	2,68 ± 1,12****	3,66 ± 1,04
Σ SFA	45,3 ± 5,5	43,8 ± 1,2
Σ MFA	15,7 ± 4,2****	11,8 ± 1,2
Σ PUFA n-6	34,4 ± 7,0****	38,5 ± 2,5
Σ PUFA n-3	4,6 ± 1,7****	5,8 ± 1,6

Hodnoty představují průměr ± SD, resp. medián a IQR (v mol %). Jsou uvedeny pouze relevantní mastné kyseliny (chybí koncentrace mastných kyselin 12:0; 14:1n-5; 20:0).

Zkratky a vysvětlivky: SFA – nasycené mastné kyseliny, MFA – monoenoové mastné kyseliny; Σ - suma (celková); PUFA n-3 (resp. – n-6) – vícenenasycené mastné kyseliny řady n-3 (resp. n-6); cis – konfigurace cis; cc – konfigurace cis cis; alc – všechny cis; označení mastné kyseliny: počet C atomů: počet dvojných vazeb, n – počet atomů C od metylového konce kyseliny k první dvojně vazbě.

U pacientů s ChP jsme našli sníženou celkovou koncentrací PUFA n-3 a PUFA n-6a zvýšenou koncentrací celkových MFA. Zvýšení koncentrace MFA bylo důsledkem elevace palmitolejové kyseliny (POA, 16:1n-7), olejové kyseliny (OA, 18:1n-9), vakcenové kyseliny (VA, 18:1n-7) a 20:1n-9. Pacienti s ChP měli sníženou koncentrací kys. linolové (LA 18:2n-6), přičemž koncentrací jejich desaturačních a elongačních produktů se obě skupiny nelišily. Koncentrací kys. α -linolenové (ALA, 18:3n-3) se obě skupiny nelišily. Koncentrace kys. eikosapentaenové (EPA, 20:5n-3) a dokosahexaenová (DHA, 22:6n-3) byly sníženy v souboru ChP.

Množství MFA bylo zvýšené u pacientů s ChP a současnou exokrinní dysfunkcí ve srovnání s pacienty s ChP a bez exokrinní dysfunkce. Koncentrace PUFA n-6 byly u pacientů s ChP a exokrinní dysfunkcí signifikantně sniženy oproti pacientům bez exokrinní dysfunkce. Koncentracemi PUFA n-3 se nemocní s ChP a současnou exokrinní dysfunkcí nelišili od nemocných bez pankreatické maldigesce. Ve skupině ChP jsme našli signifikantní korelace FELA (fecal elastase) s některými mastnými kyselinami: Σ MFA ($r = -0,387$; $P < 0,01$), Σ PUFA n-6 ($r = 0,372$; $P < 0,01$), POA ($r = -0,375$; $P < 0,01$), OA ($r = -0,333$; $P < 0,01$), VA ($r = -0,333$; $P < 0,01$), 20:2n-6 ($r = 0,386$; $P < 0,01$) a AA ($r = 0,290$; $P < 0,01$).

Vliv endokrinní dysfunkce na složení FA u pacientů s ChP jsme neprokázali. Nejistili jsme rozdíly v koncentracích SFA, PUFA n-6, PUFA n-3 u ChP s a bez endokrinní dysfunkce. Endokrinní dysfunkce u ChP byla spojena se zvýšenou koncentrací kyselin laurové (12:0) a myristové (14:0).

Diskuze

Změny v složení FA u ChP jsou komplexního původu. Pravděpodobně důležitou roli hraje příjem FA potravou (pokles LA, EPA, DHA) v důsledku maldigesce tuků i sníženého vstřebávání esenciálních FA. Zvýšené koncentrace MFA (OA, POA, VA, elaidové, 20:1n-9) souvisí se zvýšenou expresí syntézy mastných kyselin (FAS, fatty acid synthase), které může být zvýšeně exprimována ve slinivce břišní u ChP a jsou v souladu s nálezy jiných autorů (Quilliot et al. 2003, Marosvolgyi et al. 2010). V souboru ChP by pozorované zvýšení podílu MFA mohlo být způsobeno také zvýšením aktivity $\Delta 9$ desaturázy, které kompenzuje ztrátu membránové fluidity způsobené snížením obsahu PUFA n-6 v buněčných membránách. Na poruše elongace a desaturace LA a ALA se může podílet deficit selenu a zinku i přítomnost sekundárního DM. Deficit selenu a zinku byl prokázán u nemocných s etylickou ChP, u kterých jeho koncentrace negativně koreluje s $\Delta 5$ desaturázou a přítomností DM (Quilliot et al. 2003).

Závěr

U nemocných s ChP byly prokázány specifické změny ve složení FA, které jsou charakterizovány zvýšenou koncentrací MFA, především kyseliny palmitolejové, olejové a vakcenové. Současně mají nemocní s ChP snížené koncentrace kys. linolové, eikosapentaenové a dokosahexaenové. Tyto změny jsou pravděpodobně způsobeny poruchou vstřebávání tuků a následně sníženým příjmem esenciálních FA. Změny ve složení FA ukazují na změny metabolismu FA a zdůvodňují nutnost adekvátní nutriční podpory, včetně přísunu esenciálních mastných kyselin u těchto nemocných.

Studie byla podporována výzkumnými projekty: (1) RVO-VFN 641265/2012 Ministerstva zdravotnictví České republiky; (2) PRVOUK-P25/LF1/2 Karlovy Univerzity v Praze

Reference

- BEHRMAN SW., FOWLER ES. Pathophysiology of chronic pancreatitis. *Surg Clin N Am* 2007; 87: 1309-1324.
- ETEMAD B., WHITCOMB DC. Chronic pancreatitis, diagnosis, classification, and new genetic development. *Gastroenterology* 2001; 120: 682-702.
- FRENCH JJ., CHARNLEY RM. Chronic pancreatitis. *Surgery* 2010; 28: 212-217.
- GUPTA V., TOSKES PP. Diagnosis and management of chronic pancreatitis. *Postgrad Med J* 2005; 81: 491-497.
- KODYDKOVÁ J., VÁVROVÁ L., STAŇKOVÁ B., et al. Antioxidant status and oxidative stress markers in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Pancreas* 2013; 42: 614-621.
- MAROSVOLGYI T., HORVATH G., DITRICH A., et al. Fatty acid composition of plasma lipid classes in chronic alcoholic pancreatitis. *Pancreatology* 2010; 10: 580-585.
- KREMMYDA L-S., TVRZICKÁ E., STAŇKOVÁ B., ŽÁK A. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease – e review. Part 2: Fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Papers* 2011; 155: 195-218.
- QUILLIOT D., WALTER E., BÖHME P., et al. Fatty acid abnormalities in chronic pancreatitis: effect of concomitant diabetes mellitus. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 496-503.
- TVRZICKÁ E., VECKA M., STAŇKOVÁ B., ŽÁK A. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection Quantitative aspects. *Analytica Chimica Acta* 2002; 465: 337-350.
- TVRZICKÁ E., KREMMYDA L-S., STAŇKOVÁ B., ŽÁK A. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease – e review. Part 1: Classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Papers* 2011; 155: 117-130.
- WEYLANDT KH., NADOLNY A., KAHLKE L., et al. Reduction of inflammation and chronic tissue damage by omega-3 fatty acids in fat-1 transgenic mice with pancreatitis. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782: 634-641.
- WITT H., APTE MV., KEIM V., WILSON JS. Chronic pancreatitis: Challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology* 2007; 132: 1557-1573.
- ŽÁK A., TVRZICKÁ E., VECKA M., et al. Severiny of metabolit syndrome unfavorable influences oxidative stress and fatty acid metabolism in men. *Tohoku J Exp Med* 2007; 212: 359-371.
- ŽÁK A., JÁCHYMOVÁ M., TVRZICKÁ E., et al. The influence of polymorphisms of -493G/T MTP promoter and metabolit syndrome on lipids, fatty acids and oxidative stress. *J Nutr Biochem* 2008; 19: 634-641.

THE ROLE OF DICARBONYLS IN THE PATHOGENESIS OF TYPE 2. DIABETES AND ITS COMPLICATIONS

ÚLOHA DIKARBONYLŮ V PATOGENEZI DIABETU 2. TYPU A JEHO KOMPLIKACÍCH

H. Malínská, H. Kahleová, O. Oliyarnyk, J. Urbanová, L. Kazdová

Center for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague

Glycation, the nonenzymatic glycosylation of biomolecules, is commonly observed in diabetes and is a common feature of diabetic complications (Brownlee 2005). Glycation involves multiple oxidative and nonoxidative reactions, collectively termed the Maillard reaction, eventually generating advanced glycation end products (AGEs). In clinical and experimental models of diabetes, the levels of intra- and extracellular glycation products have been found to increase and glycation can potentially contribute to disease progression. The formation of glycation adducts within the cells can have severe functional consequences such as inhibition of protein activity and promotion of DNA mutations. There are specific mitochondrial targets of glycation, and mitochondrial dysfunction itself has been implicated in diabetes pathology (Pun et al. 2012). However, whether there is a causal relationship between glycation and pathology is uncertain and the mechanistic details are unclear.

Reactive dicarbonyl species (α - and β -oxoaldehydes) such as methylglyoxal (MG), glyoxal (GL) and 3-deoxyglucosone (3-DG) are thought to be major physiological precursors of glycation implicated as glycotoxic mediators of carbonyl stress. Dicarbonyls, in general, are formed as glycolytic intermediates in metabolic conversion of glucose, via Maillard reaction by degradation of glycated proteins and during lipid peroxidation process. α -oxoaldehydes are characterized by extremely high chemical activity, they are up to 20,000-fold as reactive as glucose, thus being able to form AGE-structures even at very low concentrations (Turk 2010).

It has been postulated that biogenesis of these intermediary metabolites is not exclusively dependent on persistent hyperglycemia but may be influenced by glycemia fluctuation. Toxic dicarbonyls accumulate even at normal glucose concentration. Dicarbonyls are also produced in the course of lipid and amino acid metabolism. Increased level of dicarbonyls has been connected with hypertriglyceridemia, elevated level of ketones and FFA, that are characterized for type 1 and 2 diabetes.

It appears that reactive dicarbonyls can discretely promote the pathology of diabetic complications, even in the presence of good glycemia control, as indicated by $HbA1c \leq 8\%$. According to Fleming study with diabetic patients, the 25-fold increase of MG in type 1 and 15-fold increase in type 2 diabetes under normal glucose conditions imply that normalising glucose level cannot completely prevent late diabetic complications (Fleming et al. 2012).

Evaluation of physiologic α -oxoaldehydes has not been fully investigated. However, their role has been postulated in the carbonyl stress reactions, which activate a series of inflammatory responses leading to accelerated vascular damage in diabetes and end-stage renal disease.

Reactive dicarbonyls are very reactive, but their interactions with body proteins and nucleic acids are controlled by glyoxalase system, presenting in the cytosol. This system consists of two enzymes, glyoxalase I and glyoxalase II, and a catalytic amount of reduced glutathione (GSH). So optimal activity of the glyoxalase system is dependent on adequate level of glutathione. In diabetes, both hyperglycemia and oxidative stress are associated with

GSH depletion and may entail impaired detoxification of MG. The sustained increase in the MG level may also be the consequence of decreased clearance by detoxification pathways.

The effect of MG on pathology of diabetes

Methylglyoxal has a toxic effect on insulin secretion from pancreatic β -cells, and on modifications of proteins and nucleic acids. Moreover, methylglyoxal is one of the major precursors of AGEs.

An increase intracellular MG content leads to inhibition of insulin-induced signaling, interfere with insulin-signaling molecules and may induce insulin-resistance state. MG induces an inhibition of insulin-stimulated phosphorylation of protein kinase B and consequently impair insulin-induced insulin receptor substrate-1 phosphorylation (Riboulet-Chavey et al. 2006). By such a mechanism, which is independent of the formation of intracellular ROS, MG may not only induce the debilitating complications of diabetes but may also contribute to the pathophysiology of diabetes in general (has been confirmed only in isolated L6 muscle cells). In different studies, plasma MG concentration in diabetic subjects varied from 6-fold and 2-fold increased to the comparable level found in non-diabetic control subjects. The carbonyls level in tissues (0.1-10 $\mu\text{mol/g}$) are markedly higher compared to plasma level (50-200 nmol/l). A significant association of MG-adducts serum level with LDL-cholesterol was observed but only in hypercholesterolemic diabetic subjects, not in normolipidemic. Urinary excretion of MG-adducts tightly correlated with triglycerides level (Turk et al. 2011). Increased level of dicarbonyls in tissues impair proteins, lipids and DNA, lead to AGE production, activate inflammatory processes and increase oxidative stress. MG was shown to activate stress and apoptotic pathways in cell. However today is not exactly clarified the causative role in the pathogenesis, especially in human subjects, nor the differences in each carbonyls.

The effect of MG on vascular complications in diabetes

Dicarbonyls are strong precursors of AGE, commonly associated with vascular lesions. Recent studies suggest that reactive dicarbonyls might play important role in diabetic vascular complications and could be early biomarker risk for these complications.

It is considered that monitoring of reactive dicarbonyls in diabetic patients might help to assess the risk of progression of diabetic complications. In Fleming study hypothesises that those diabetic patients who have an increased accumulation of methylglyoxal and triosephosphate intermediates are those patients who are prone to the development of late diabetic complications, despite good glycaemic control (Fleming et al. 2012).

MG is one of the causative factors in the pathogenesis of atherosclerosis and development of macrovascular diabetic complication. MG induced endothelial dysfunction in Wistar rats and aggravated endothelial dysfunction in Goto-Kakizaki diabetic rats. The mechanism which is involved are increased oxidative stress, AGEs formation and a decrement in NO bioavailability (Sena et al. 2012).

MG has been postulated also to play a role in the development of hypertension. However, functional links between MG biogenesis and hypertension have only been documented in rat model but not yet in humans.

Excessive production of dicarbonyls may be a link connecting an acute metabolic event with accelerated tissue damage, a feature characteristic of long-term complications of diabetes.

The role of MG in adipose tissue dysfunction

According to recent studies dicarbonyls and glycation effect play important role in adipose tissue dysfunction. MG causes structural and functional alterations in adipose tissue

independently of obesity and contributes to dysfunction of adipose tissue during type 2 diabetes progression (Matafome et al. 2012).

MG-induced alterations in adipose tissue in Goto-Kakizaki rats acting simultaneously with other player, such as hyperlipidemia, leading to adipose tissue dysfunction.

In study with Sprague-Dawley rats MG accumulation impaired insulin signaling in adipose tissue and may contribute to adipose tissue insulin resistance (Dhar et al. 2011).

Dicarbonyls determination

Levels of reactive dicarbonyls (MG, GL and 3-DG) in plasma and tissues were determined in our laboratory by high performance liquid chromatography. Samples were denaturated with 0.5 M acetic acid. An aliquot of this solution was derivatized in the presence of 0.1 M potassium-phosphate buffer and derivatization agent DDB (Biphenyl Dimethyl Dicarboxylate). Samples were injected in a C18 column (3.9 mm x 150 mm, Waters Corporation) using two mobile phases – A: 20mM ammonium formate and B: methanol 65/35, pH = 3.8, flow 0.8 ml/min and with fluorescence detection 352/386 nm.

Conclusion

Protein glycation leading to AGE formation is enhanced in diabetes. The increased generation of glycotoxins occurs due to both alterations in cellular metabolism and inefficiency of the related scavenger mechanisms.

Reactive dicarbonyls seems to be a common product of both carbonyl and oxidative stress and its biogenesis related to glycemic and lipid status in diabetic patients.

Determination of reactive dicarbonyls could be used as a clinical marker of risk for development of diabetic complications primarily macrovascular, and for the effect in therapeutic monitoring.

Supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization („Institute for Clinical and Experimental Medicine – IKEM, IN 00023001“).

References

- BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615-1625.
- DHAR A., DHAR I., JIANG B., et al. Chronic methylglyoxal infusion by minipump causes pancreatic beta-cell dysfunction and induces type 2 diabetes in Sprague-Dawley rats. *Diabetes* 2011; 60: 899-908.
- FLEMING T., CUNY J., NAWROTH G., et al. Is diabetes an acquired disorder of reactive glucose metabolites and their intermediates? *Diabetologia* 2012; 55: 1151-1155.
- MATAFOME P., SANTOS-SILVA D., CRISÓSTOMO J., et al. Methylglyoxal causes structural and functional alterations in adipose tissue independently of obesity. *Arch Physiol Biochem* 2012; 118: 58-68.
- PUN PB., MURPHY MP. Pathological significance of mitochondrial glycation. *Int J Cell Biol* 2012; 2012:843505.
- SENA CM., MATAFOME P., CRISÓSTOMO J., et al. Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. *Pharmacol Res* 2012; 65: 497-506.
- RIBOULET-CHAVEY A., PIERRON A., DURAND I., et al. Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. *Diabetes* 2006; 55: 1289-1299.
- TURK Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. *Physiol Res* 2010; 59: 147-156.
- TURK Z., CAVLOVIĆ-NAGLIĆ M., TURK N. Relationship of methylglyoxal-adduct biogenesis to LDL and triglyceride levels in diabetics. *Life Sci* 2011; 89: 485-490.

THE ROLE OF INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN THE DEVELOPMENT OF CARDIOVASCULAR DISORDERS

O. Oliyarnyk¹, H. Malinska¹, H. Seidlova¹, L. Kazdova¹, M. Pravenec²

¹Center for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

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

Abstract

Growing evidence indicate that inflammation and oxidative stress might contribute to the development of cardiovascular disease but the mechanism is not fully elucidated. In our study, we investigated the effect of transgenic expression of human C-reactive protein (CRP) on antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in myocardium and kidney in SHR rats. Overexpression of CRP was associated with cardiac hypertrophy (myocardial weight: 0.420 ± 0.014 vs 0.377 ± 0.040 g /100g b.wt. $p < 0.05$), reduced activity of superoxide dismutase (0.452 ± 0.037 vs. 0.564 ± 0.038 U/mg protein, $p < 0.05$), glutathione peroxidase (360 ± 28 vs. 525 ± 23 $\mu\text{mol GSH}/\text{min}/\text{mg}$ protein, $p < 0.001$) and elevated concentration of TBARS (2.32 ± 0.15 vs. 1.76 ± 0.14 nM/mg protein $p < 0.05$). CRP overexpression contributed to renal dysfunction determinate as increased urinary albumin excretion (albumin to creatinine ratio: 131 ± 18 vs. 20 ± 1 mg/g, $p < 0.001$) and elevated oxidative stress. Taken together, increased inflammation in transgenic SHR rats overexpressing human CRP was associated with insulin resistance and elevated oxidative stress in myocardium and kidney. These findings suggest that elevated CRP can directly promote cardiorenal disorders.

Introduction

Cardiovascular disease (CVD) are consider to be the most case of morbidity and mortality in Europe and North America. Most widespread CVD are ischemic heart disease, cerebrovascular disease, peripheral vascular disease, and cardiomyopathy progressing to the heart failure. The most important case of the ischemic heart disease and brain stroke is atherosclerosis of coronary and cerebral blood vessels with consecutive plaque rupture and thrombosis. Cardiomyopathy was described as reduced cardiac function (initially only diastolic dysfunction) independent of ischemia or hypertension (Mandavia 2012).

Recent observations from clinical trials have enhanced the interest in the interaction between heart and kidney. Renal dysfunction has been shown as an independent risk factor for the development of CVD and is associated with worsened outcome in patients with hypertension and post myocardial infarction. Conversely, cardiac dysfunction, leads to a gradual decrease in renal function as reflected by an increase in creatinine level and microalbuminuria. This interaction between heart and kidney, where disorder of either one of them leads to dysfunction of the other, is usually referred to the cardiorenal syndrome (Szymanski, 2012).

Cardiac dysfunctions are influenced by proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. The first group contain: TNF α (the role in myocytes cellular remodeling and apoptosis), IL-1 β (myocardial fibrosis), IL-6 (NF- κ B activation and induction of liver CRP synthesis), IL-18 (induces osteopontin and mediates fibrosis). To the second group belong: IL-4 (inhibits the production of proinflammatory cytokines, but upregulates the fibrotic response), IL-10 (inhibits the secretion of TNF- α , found to be decreased in patients with CVD) (Flores-Arredondo 2011). Recent studies have provided some evidence that biomarker of inflammation, C-reactive protein, is closely related to CVD and turned considerable attention to CRP as risk factor for cardiorenal syndrome (Schwartz 2007).

Clinical and experimental studies provided evidence, that chronic inflammation could promote oxidative stress, which plays a causative role in pathogenesis of CVD. Oxidative stress can be considered as imbalance in tissue production of reactive oxygen species (ROS), often measured as concentration of lipid peroxidation products, and degradation of ROS by antioxidant enzymes and non-enzymatic antioxidants (Rolo 2012). The most important antioxidant enzymes are: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR) and catalase, non-enzymatic antioxidants- reduced glutathione (GSH), vitamins C and E.

Chronic inflammation and oxidative stress are often connected to the state of insulin resistance, which together are considered to be major risk factors for the development of CVD, but mechanism is not fully elucidated. Because human CRP can activate rat complement and can be proinflammatory in rats, we investigated in present study the effect of increased expression of human CRP on cardiac and renal function, insulin resistance and oxidative stress in transgenic spontaneously hypertensive rats (SHR), a well established animal model of genetic hypertension and insulin resistance.

Materials and methods

Four months old male SHR rats expressing the human CRP gene (SHR-Tg) under control of the apolipoprotein E promoter were used. Control group comprised age-matched SHRs with absence of the transgene. Rats were fed a high fructose diet (60% fructose) for 14 days.

Concentration of human CRP and proinflammatory cytokines was measured using ELISA kits (CRP-Alpha Diagnostics, TX, USA; IL-6- Invitrogen, CA, USA; TNF α - Biosource, CA, USA). Glucose and triacylglycerols concentration were measured by enzymatic methods (kits from Erba Lachema, Czech Republic). Systolic blood pressure (24 hour averages) measured by telemetry. Urinary albumin excretion, expressed as ratio of albumin to creatinine was measured by HPLC with UV-detection. Antioxidant enzymes activity, GSH, conjugated dienes, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were detected spectrophotometrically by well-described methods (Malinska 2010).

Results

In SHR-Tg levels of human CRP approximated the endogenous levels of CRP normally found in the rat whereas no human CRP was detected in serum of SHR negative controls (270 ± 52 vs. 7 ± 1 mg/l, $p < 0.001$). We have shown increased serum IL-6 in SHR-Tg (36.4 ± 5.1 vs. 18.0 ± 1.7 pg/ml, $p < 0.01$). In contrast, TNF α concentration was not different between transgenic and control SHR rats.

Overexpression of CRP was associated with cardiac hypertrophy (myocardial weight: 0.420 ± 0.014 vs. 0.377 ± 0.040 g/100g b.wt., $p < 0.05$). Systolic blood pressure was 10-15 mmHg greater in SHR-Tg than in SHR controls ($p < 0.05$). We found decreased activity of antioxidant enzymes (SOD and GSH-Px) in myocardium (Table 2). The activity of GR tended to increase but not significantly. The content of GSH in myocardium was significantly diminished in SHR-Tg compared to control SHR rats. Impaired antioxidant defense contributed to elevated lipid peroxidation, determined as increased myocardial concentration of TBARS in SHR-Tg rats.

In SHR rats with transgenic expression of human CRP genes we found elevated concentration of urine albumin in comparison to control SHRs. Creatinine level was similar in both groups, thus albumin to creatinine ratio was markedly higher in SHR-Tg (Table 1). Cardiorenal disorders were associated with manifestation of insulin resistance in SHR-Tg group, determined as increased both fasted (4.048 ± 0.171 vs. 3.630 ± 0.09 mmol/l, $p < 0.05$) and fed (7.278 ± 0.121 vs. 6.760 ± 0.131 mmol/l, $p < 0.01$) glycemia, triacylglycerols level in serum (1.752 ± 0.371 vs. 0.653 ± 0.050 mmol/l, $p < 0.05$) and liver

(11.54 ± 1.98 vs. 4.65 ± 0.35 $\mu\text{mol/g}$, $p < 0.01$), elevated serum non-esterified fatty acids (0.757 ± 0.069 vs. 0.329 ± 0.034 mmol/l , $p < 0.001$).

Transgenic rats exhibited decreased renal antioxidant enzymes activities (SOD, GSH-Px and catalase) and GSH concentration. We found increased levels such initial lipid peroxidation products- conjugated dienes as final products- TBARS (Table 2).

Table 1. Urea ratio of albumin and cGMP to creatinine in SHR expressing human CRP

	SHR	SHR-Tg
Albumin, mg/l	24 ± 4	$162 \pm 31^{**}$
Creatinine, mmol/l	10.0 ± 1.2	9.8 ± 1.5
Albumin/creatinine, mg/g	20 ± 1	$131 \pm 18^{***}$
cGMP/creatinine, nmol/mmol	0.235 ± 0.015	$0.177 \pm 0.021^*$

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

Table 2. Oxidative stress parameters in SHR rats expressing human CRP

Tissue	SHR	SHR-Tg
Superoxide dismutase		
Myocardium, U/mg protein	0.564 ± 0.038	$0.452 \pm 0.037^*$
Renal cortex, U/mg protein	0.386 ± 0.019	$0.304 \pm 0.022^*$
Glutathione peroxidase		
Myocardium, $\mu\text{mol GSH/min/mg protein}$	525 ± 23	$360 \pm 28^{***}$
Renal cortex, $\mu\text{mol GSH min/mg protein}$	512 ± 18	$292 \pm 19^{***}$
Glutathione reductase		
Myocardium, nmol NADPH/min/mg protein	176 ± 19	193 ± 19
Renal cortex, nmol NADPH/min/mg protein	236 ± 23	268 ± 19
Catalase		
Myocardium, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/ mg protein}$	383 ± 22	413 ± 20
Renal cortex, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/ mg protein}$	671 ± 19	$595 \pm 25^*$
Reduced glutathione		
Myocardium, $\mu\text{mol/mg protein}$	27.4 ± 01.07	$15.5 \pm 01.5^{***}$
Renal cortex, $\mu\text{mol/mg protein}$	12.7 ± 0.6	$9.0 \pm 0.8^{***}$
Conjugated dienes		
Myocardium, nmol/mg protein	31.9 ± 02.8	37.8 ± 2.4
Renal cortex, nmol/mg protein	20.8 ± 1.1	$26.8 \pm 1.6^{**}$
TBARS		
Myocardium, nmol/mg protein	1.756 ± 0.149	$2.318 \pm 00.149^*$
Renal cortex, nmol/mg protein	1.111 ± 0.055	$1.456 \pm 0.102^{**}$

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

Discussion

Many clinical studies have shown associations between elevated CRP level and increased risk for cardiovascular disorders and many components of metabolic syndrome (Hafner 2006, Cachofeiro 2008). In the present study we have found a relation between overexpression of human CRP, increased serum IL-6 concentration, cardiac hypertrophy and increased blood pressure, and that these changes may be mediated by oxidative damage in myocardium and kidney.

Increased ROS production in myocardium and renal cortex, measured as elevated concentration of lipid peroxidation products, was associated with decreased activity of antioxidant enzymes. SOD-activity was reduced in myocardium and renal cortex of SHR-Tg. The inhibition of SOD can be ascribed to: 1) oxidative modification of the enzyme molecules by ROS: breaking at position Pro62-His63 (Takata 1996) and/or SOD inactivation by peroxynitrite radicals, which content is usually elevated in hypertension (Yamakura 1998); 2) hyperglycemic conditions contribute to the Cu-Zn SOD glycation and so led to inactivation and fragmentation of the enzyme. The primary glycation sites in SOD molecule are lys 211 and lys 212 in the putative heparin-binding domain at the C-terminal and contribute to 40-60 % reduction of enzyme activity (Adachi 1992).

The concentration of GSH was markedly lower in both tissues of SHR-Tg compared to control SHR rats. Decreased GSH might be ascribed to impaired activity of the key enzyme in GSH synthesis- liver γ - glutamylcysteinylase (Zhu 2007) and/or enhanced GSH cleavage in γ - glutamyl cycle due to increased γ -glutamyl transferase activity in hypertension (Caliskan 2007).

Low GSH content implies diminished GSH-Px activity, which can increase the propensity for oxidative stress. Reduced GSH-Px activity might be due to oxidative modification of GSH-Px molecules by ROS in Se-binding domain and/or glycation of enzyme molecules during hyperglycaemic conditions (Suravajjala 2013).

Catalase activity was shown to be decreased in renal cortex in SHR-Tg, which could be ascribed to increasing of NO production. Nitric oxide has been shown to depress catalase activity by binding to the ferric iron in the heme moiety of this enzyme (Jiang 2003).

In the current study, transgenic expression of human CRP was also associated with reduced urinary excretion of cGMP suggesting that increased levels of CRP may be attenuating NO production. It has been reported that CRP might reduce the activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) by affecting the stability of eNOS mRNA either directly or through the action of IL6 or TNF α . In addition, it has been shown that CRP can activate NADPH oxidase and cause increases in reactive oxygen species that may decrease NO production by inducing eNOS uncoupling (Hein 2009). Consistent with the current findings, *Guan et al* recently reported that virus mediated expression of human CRP in the rat also induces increased in blood pressure and decreases in urinary cGMP. Taken together, these observations support the possibility that increases in human CRP might aggravate hypertension and features of the metabolic syndrome in part by reducing NO bioavailability (Pravenec 2011).

There is growing evidence that chronic inflammation is related to renal impairment, and we therefore examine the association of CRP overexpression with microalbuminuria, a marker of early kidney injury. Our result have shown that transgenic expression of human CRP was associated with microalbuminuria and oxidative stress in kidney. In the mechanism of oxidative stress may play a role impaired activity of glutathione peroxidase, reduction of glutathione levels and increased lipid peroxidation measured in renal cortex.

Conclusion

In the current study we found that transgenic expression of human CRP in SHR rats increased inflammation and oxidative stress in myocardium and kidney. Insufficient compensation of oxidative stress due to mostly diminished antioxidant enzymes activity and increased lipid peroxidation is a confirmation of antioxidant defense failure in condition of CRP overexpression. Our results suggest that increased CRP can directly increased oxidative injury in both myocardium and kidney.

Supported by Ministry of Health, Czech Republic - conceptual development of research organization ("Institute for Clinical and Experimental medicine- IKEM, IN 00023001").

References

- ADACHI T., OHTA H., HAYASHI K., et al. The site of nonenzymic glycation of human extracellular-superoxide dismutase in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* 1992; 13: 205-210.
- CACHOFEIRO V., GOICOCHEA M., DE VINUESA SG., et al. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* 2008; 74: 4-9.
- CALISKAN M., ERDOGAN D., GULLU H., et al. Association between serum gamma-glutamyltransferase levels and coronary microvascular function in hypertensive patients. *J Hypertens* 2007; 25: 2497-2503.
- FLORES-ARREDONDO JH., GARCIA-RIVAS G., TORRE-AMIONE G. Immune modulation in heart failure: past challenges and future hopes. *Curr Heart Fail Rep* 2011; 8: 28-37.
- GUAN H., WANG P., HUI R., et al. Adeno-associated virus-mediated human C-reactive protein gene delivery causes endothelial dysfunction and hypertension in rats. *Clin Chem* 2009; 55: 274-284.
- HAFNER SM. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006; 97: 3A-11A.
- HEIN TW., SING U., VASQUEZ-VIVAR J., et al. Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo. *Atherosclerosis* 2009; 206: 61-68.
- JIANG Q, AMES BN. Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *FASEB J* 2003; 17: 816-822.
- MALINSKA H., OLIYARNYK O., HUBOVA M., et al. Increased liver oxidative stress and altered PUFA metabolism precede development of non-alcoholic steatohepatitis in SREBP-1a transgenic spontaneously hypertensive rats with genetic predisposition to hepatic steatosis. *Mol Cell Biochem* 2010; 335: 119-258.
- MANDAVIA CH., PULAKAT L., DEMARCO V., SOWERS JR. Over-nutrition and metabolic cardiomyopathy. *Metabolism* 2012; 61: 1205-1210.
- PRAVENEK M., KAJIYA T., ZÍDEK V., et al. Effects of human C-reactive protein on pathogenesis of features of the metabolic syndrome. *Hypertension*. 2011; 57: 731-737.
- ROLO AP., TEODORO JS., PALMEIRA CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine* 2012; 52: 59-69.
- SCHWARTZ R., OSBORNE-LAWRENCE S., HAHNER L., et al. C-reactive protein downregulates endothelial NO synthase and attenuates reendothelialization in vivo in mice. *Circ Res* 2007; 100: 1452-1459.
- SURAVAJJALA S., COHENFORD M., FROST L., et al. Glycation of human erythrocyte glutathione peroxidase: effect on the physical and kinetic properties. *Clin Chim Acta* 2013; 421: 170-176.
- SZYMANSKI MK., BOER RA., NAVIS GJ., et al. Animal models of cardiorenal syndrome: a review. *Heart Fail Rev* 2012; 17: 411-420.
- TAKATA I., KAWAMURA N., MYINT T., et al. Glycated Cu,Zn-superoxide dismutase in rat lenses: evidence for the presence of fragmentation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219: 243-248.
- YAMAKURA F., TAKA H., FUJIMURA T., MURAYAMA K. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* 1998; 273: 14085-14089.
- ZHU H., CAO Z., ZHANG L., et al. Glutathione and glutathione-linked enzymes in normal human aortic smooth muscle cells: chemical inducibility and protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced injury. *Mol Cell Biochem* 2007; 301: 47-59.

EFFECT OF METFORMIN ON ENERGY METABOLISM IN THE LIVER: APPLICATION OF ³¹P-NMR SPEKTROSCOPY

E. Paleníčková, M. Cahová, M. Burian, O. Oliyarnyk, Ch. Gladková, Z. Papáčková,
L. Kazdová

Center for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague

Abstract

Metformin is used extensively to treat type 2 diabetes due to its anti-hyperglycemic effects but it also exhibits remarkable antioxidant activity. Recent results suggest that both these functions are consequent to its influence on mitochondrial respiration and cell energy metabolism. We focused on the effect of metformin on chronic (high fat diet-induced) and acute oxidative stress evoked by short-term warm ischemia followed by reperfusion (I/R) in the rat liver. Using direct ³¹P NMR measurements we proved that long-term metformin administration compromises the energy state of the liver (the decreased ATP repletion after ischemic injury) but that it also protects liver from I/R-induced oxidative stress measured as lipoperoxidation. The protective effect of metformin against oxidative damage is associated both with the increased activity of antioxidant systems as well as with its influence on mitochondrial respiration. We propose that the antioxidative properties of metformin may be, at least partly, associated with its inhibitory effect on mitochondrial respiratory chain complex I and attenuation of electron flux through the respiratory chain.

Introduction

Metformin is an oral antihyperglycemic drug widely used in the treatment of type 2 diabetes (Bailey 1996). Its primary effect is the suppression of hepatic glucose production and the enhancement of peripheral glucose uptake. Nevertheless, there are evidences that besides this well-known antihyperglycemic effect metformin also protects against oxidative stress in different tissues but the antioxidant activity of metformin is not well understood. Somewhat surprisingly, there is not much data regarding the effect of metformin on oxidative stress in fatty liver in insulin resistance. In order to gain more information about the possible therapeutic potential of metformin in this field we studied the effect of metformin on chronic (HFD-induced) and acute oxidative stress induced by short-term warm ischemia-reperfusion.

Methods

Experimental design

Male Wistar rats (300 ± 15 g) were fed either standard (SD) or high-fat (HFD) diet for 10 weeks. Part of the animals in both dietary groups received metformin (150 mg/kg). At the end of the experiment, the animals were anesthetized and partial ischemia was induced by the vena porta ligation for 30 min. Then the blood circulation was restored and the animals were left to recover for 48 hrs prior decapitation.

Results

Metformin decreases mitochondrial respiration both in vitro and after administration in vivo

Some evidence indicates that metformin partially inhibits complex I of mitochondrial respiratory chain. As such, it may diminish the electron flow through the respiratory chain what, consequently, could manifest itself as the reduced formation of reactive oxygen species. In order to verify this presumption we measured the direct influence of metformin on mitochondrial respiration in vitro or after long-term administration in vivo. Fig. 1 illustrates the dose-dependent inhibitory effect of metformin on fully (glutamate +malate, fig. 1A) or

partially (palmitoylcarnitin, fig. 1B) NADH-dependent substrates. EC₅₀ for both substrates was 5mM metformin, the 80 % inhibition of respiration was reached at the 10 mM concentration. Metformin had no effect on the respiration of FADH-, i.e. complex II-dependent substrate (succinate, fig. 1C). The respiratory control, i.e. the ratio of oxygen consumption in the presence and absence of ADP, was not affected by metformin what indicates that metformin does not function as an uncoupler (not shown).

We demonstrated that metformin administered *in vitro* directly to the suspension of mitochondria inhibits the respiration of NADH-dependent substrates but the effective concentration was 100times higher than those found in serum of metformin-treated rats. In order to check up whether metformin administered *in vivo* could exert the same inhibitory properties on mitochondrial respiration we determined *in vitro* activity of selected mitochondrial enzymes, the respiration of isolated mitochondria and the utilization of glucose and palmitate in liver slices prepared from rats fed metformin for 10 weeks. The activities of NADH : cytochrome c oxidoreductase and NADH : DCPIP oxidoreductase complexes were inhibited by both HFD and metformin, the effect of metformin being additive to the lowering effect of HFD itself. Accordingly, in isolated mitochondria HFD administration reduced mitochondrial respiratory capacity towards all tested substrates. *In vivo* metformin administration specifically decreased the oxidation of glutamate + malate and palmitoylcarnitine but it had not significant effect on succinate oxidation. Similar results were obtained on liver slices from the liver of metformin-treated animals that were incubated with radioactive fatty acid (palmitate) or glucose. HFD alone decreased the CO₂ production from palmitate, but not from glucose. Metformin treatment further diminished the palmitate oxidation and decreased the glucose oxidation. In accordance with these observations, we found the accumulation of TCA cycle intermediates what confirms the incomplete utilization of palmitate and increased formation of lactate, i.e. an anaerobic utilization of glucose.

Metformin slows down ATP synthesis in the liver in vitro

The evidence given in the previous paragraph strongly indicated that metformin administered *in vivo* attenuates mitochondrial respiration. If so, metformin should affect also the ATP synthesis. In order to confirm this hypothesis we measured the extent and rate of ATP repletion during reperfusion after partial liver ischemia (fig. 2) using ³¹P MR spectroscopy. The restraint of blood supply led to rapid fall of ATP levels in all three groups. In SD group, ATP rapidly (within 15 min of reperfusion) resumed the original values. In HFD group, ATP content didn't fully recover within examination time as it reached only approx. 80 % of pre-ischemic values but the rate of ATP resynthesis was not significantly different from the SD group. The SD and HFD curves were significantly different ($p < 0.05$) during the second hour of the reperfusion ($t_{60} - t_{120}$). Metformin further emphasized the effect of HFD as far as the end-point ATP concentration is concerned. It reached only 60% of initial values after 120 min reperfusion and the ATP repletion in HFD+met group was also significantly slower than for both other groups. The HFD+met and HFD curves were significantly different ($p < 0.05$) during the first 40 min of reperfusion ($t_{20} - t_{60}$).

Metformin decreases oxidative stress-induced lipoperoxide formation in vivo

During reperfusion, the rapidly elevated ROS production is responsible for massive oxidation of biomacromolecules like lipids. HFD itself increased the oxidative stress measured as TBARS content in the liver (fig. 3). As expected, ischemia and reperfusion comparably increased lipoperoxide formation in both groups. Importantly, in both SD and HFD group metformin administration diminished the oxidative stress by 30 % and 25 %, resp. These results suggest that metformin by some mechanism either prevents the oxidative stress or intensify the antioxidative defense.

The effect of metformin on the antioxidative mechanisms in vivo

The previous data demonstrated that metformin significantly alleviates oxidative stress evoked by HFD itself or, more pronouncedly, in combination with ischemia/reperfusion. We further tested whether the metformin effect is mediated by the increased activity of antioxidative mechanisms. In our experiments, HFD administration itself attenuated the antioxidative mechanisms in the liver – the GSH stores were diminished and the activities of GSH-Px and Mn-SOD were decreased (table 1). Metformin treatment normalized all parameters affected by the diet alone. In HFD group, the oxidative stress evoked by ischemia/reperfusion resulted in further exhaustion of GSH content in liver mitochondria and in the reduction of the antioxidant enzyme activities in average by 50% compared with the values in non-ischemic animals. In this group, metformin treatment led to the partial restoration of GSH content and enzyme activities. In SD group, the impact of ischemia/reperfusion was less serious and also the effect of metformin was not significant with the only exception Mn-SOD.

		SD	SD+met	P SD vs SD+met	HFD	HFD+met	P HFD vs HFD+met
GSH mM/ mg prot	sham	4.9±0.5	6.1±0.6	n.s.	3.7±0.2	5.1±0.2	0.0005
	I - R	3.3±0.4	3.6±0.3	n.s.	1.5±0.2 [†]	2.4±0.1	0.006
GSH-Px	sham	628±33	660±39	n.s.	456±27 [†]	595±13	n.s.
	I - R	478±22	479±25	n.s.	258±20 [†]	435±41	0.003
Catalase μM H ₂ O ₂ /min/mg prot	sham	585±46	583±34	n.s.	764±37 [†]	652±29	0.03
	I - R	488±33	485±49	n.s.	324±8 [†]	540±33	0.0001
Mn-SOD μU/mg prot	sham	152± 8.5	158± 8.3	n.s.	118±8 [†]	157±7.5	0.005
	I - R	101±5	128±5.5	0.004	79±5 [†]	130±7.9	0.002

Table 1 The effect metformin on antioxidative mechanisms in the liver of rats exposed to the ischemia/reperfusion. GSH content was determined in the isolated mitochondrial fraction, all other parameters were determined in the whole liver homogenate. [†] p < 0.05, ^{††} p < 0.01 HFD vs SD

Metformin reduces oxidative stress-induced mitochondrial damage in vivo

The lower oxidative stress may result in the less severe mitochondrial damage in metformin treated animals exposed to stress conditions compared with the untreated ones. In order to verify this hypothesis we determined the cytochrome c release into cytosol. In the liver exposed to ischemia/ reperfusion we found the increased cytochrome c content in the cytosol what suggest its leak from outer mitochondrial space. This leak was not found in metformin treated animals what indicates less mitochondrial injury.

Discussion

Our data show that in vivo, metformin protects both steatotic and normal liver from oxidative stress-related hepatotoxic injury caused by I/R and that this effect is, at least partly, mediated by prevention of mitochondrial damage and subsequent apoptosis.

Beside their prominent role in cellular energy metabolism, mitochondria play central role also in control of cellular death consisting with release of apoptotic signaling molecules (like cytochrome c) as well as production of ROS. Our data indicate that metformin, both in vitro and in vivo, partially inhibits mitochondrial respiration. On the other hand, attenuation of mitochondrial respiration compromises the hepatocytes energy state. Using direct ³¹P-NMR measurements in vivo we demonstrated that long-term metformin treatment decreased ATP repletion during reperfusion both in terms of rate and absolute quantity. As we have previously shown that metformin does not function as an uncoupler this decrease in ATP content reflects the weaker performance of mitochondrial respiratory chain. The low ATP availability is generally an unfavorable condition and may contribute to the high dose metformin toxicity but we suggest in the limited extent it may be the mechanism responsible for antioxidant metformin capacity especially against acute oxidative stress.

We suggest that in this case the attenuated electron flux through mitochondrial respiratory chain resulted in lower ROS production and consequently contributed, together with the increased activity of antioxidant systems, to the alleviation of the oxidative injury and mitochondrial damage. Two production sites for ROS are recognized at the respiratory chain: complex I and complex III (Kudin 2004). Nevertheless, complex I appear to be crucial for the regulation of mitochondria-related ROS production, possibly at both forward and reverse electron fluxes (Vinogradov 2005). It has been reported that complex I inhibition prevented oxidative stress-related cell death (Chauvin 2001). In an elegant study, Battandier (2006) clearly demonstrated that metformin powerfully inhibits ROS production linked to the reverse electron flux at complex I and does not increase the forward flux-related ROS production. They concluded that this unique property may be related to the therapeutic properties of metformin as an antioxidant.

In conclusion, the findings of this study demonstrate that metformin protected fatty liver from acute oxidative stress-related mitochondrial injury and apoptosis. The mechanism of metformin antioxidant action involves the increase of antioxidant enzyme in combination with the inhibition of ROS production due to its inhibitory effect on mitochondrial respiratory chain complex I. The presented data support the extension of the therapeutic application of metformin above its main application as a hypoglycemic drug.

This study was supported by the grant by grant no. P301/11/2418 from GA CR.

References

- BAILEY CJ., TURNER RC. Metformin. *New Engl J Med* 1996; 334: 574-579.
- BATTANDIER C., GUIGAS B., DETAILLE D., et al. The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr* 2006; 38: 33-42.
- CHAUVIN C., DE OLIVEIRA F., RONOT X., et al. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 41394-41398.
- KUDIN AP., BIMPONG-BUTA NY., VIELHABER S., et al. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 2004; 279: 4127-4135.
- VINOGRADOV AD., GRIVENNIKOVA VG. Generation of superoxide-radical by the NADH:ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70: 120-127.

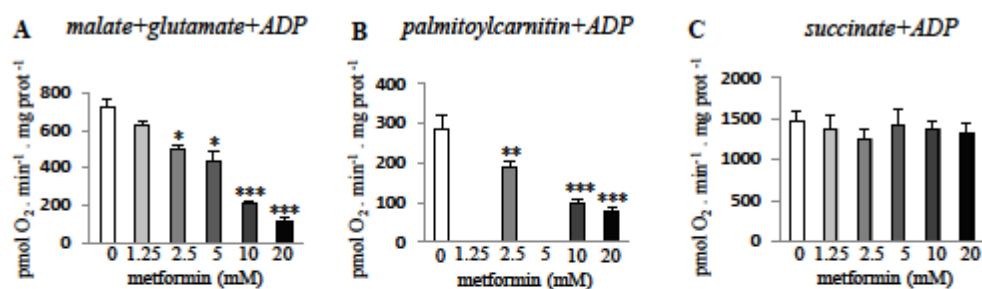


Figure 1 Effect of metformin on mitochondrial respiration in vitro. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ metformin-treated vs untreated

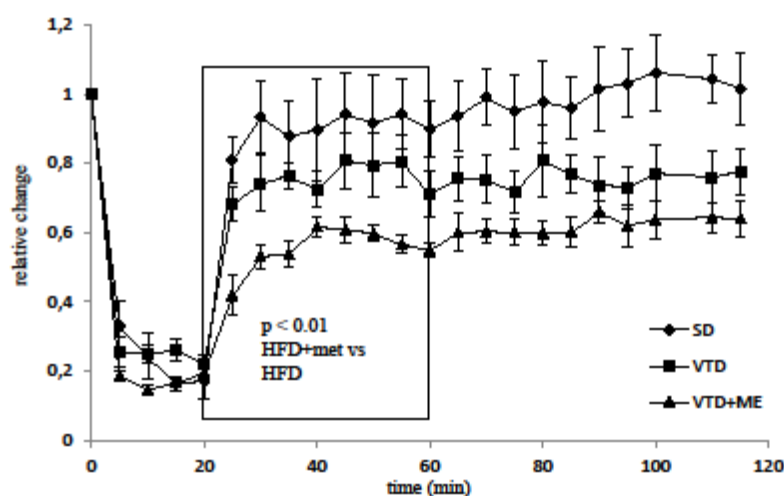


Figure 2 Effect of metformin on ATP content during ischemia/reperfusion. Data are expressed as relative change compared to pre-ischemic values for each animal.

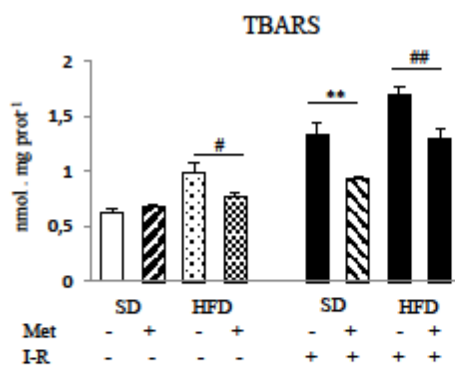


Figure 3 Effect of metformin on ischemia reperfusion-induced lipoperoxide formation. ** $p < 0.01$ SD+met vs SD; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ HFD+met vs HFD

SILYMARIN UP-REGULATED CYTOCHROME P450 IN HEREDITARY HYPETRIGLYCERIDEMIC RATS

M. Poruba¹, L. Kazdová², A. Zachařová¹, Z. Matušková¹, O. Oliyarnyk², N. Škottová¹, P. Anzenbacher¹ a R. Večeřa^{1*}

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

²Center for Experimental Medicine, Institute for clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

*Corresponding author: tel.: +420 585 632 553; fax.: +420585632966;
e-mail: vecera@seznam.cz

Abstract

Silymarin is a standardized extract from Milk Thistle (*Silybum marianum*). This extract is used in supportive therapy of liver diseases for centuries (Rainone 2005) and showed positive effects on lipoprotein profile (Škottová et al 2003). This work studied effect of silymarin on rat cytochrome P450 - CYP2C6. This cytochrome P450 can also be regarded as a counterpart of human CYP2C9 (Daniel et al 2006). Rat CYP2C6 and human CYP2C9 are known to share some substrates (both catalyze the 4'-hydroxylation of diclofenac (Leemann et al 1993) and 7-hydroxylation of warfarin (Daniel et al 2006)). High significance of human CYP2C9 in metabolism of many drugs (ibuprofen, diclofenac, warfarin and others) is well documented (Mo et al 2009). This work aims to investigate effect of silymarin (1 % w/w), administered in high cholesterol and high fat diet (HCD) for 21 days, on the expression of liver CYP2C6 in hereditary hypertriglyceridemic (HHTg) rats. These animals selected from Wistar rats exhibit hypertriglyceridemia, liver steatosis, insulin resistance, and hypertension. This strain of rat represents an accepted model of metabolic syndrome (Vrána et al 1990). Experimental high cholesterol diet (high content of cholesterol and saturated fatty acids), is used to simulate the unhealthy diet often seen in patients suffering from metabolic syndrome (Charlton et al 2011). Our work show that silymarin significantly increased mRNA expression and activity of CYP2C6 in HHTg rats. It may be suggested that this extract has the potential to influence levels of drugs metabolized by rat CYP2C6 (under conditions associated with metabolic syndrome and ectopic lipid accumulation in liver). Further studies are needed to elucidate the effects of silymarin on CYP2C9 in man and also on other pleiotropic pathways, including the effect of pathological state and diet in humans.

Úvod

Cytochrom P450 CYP2C6 hraje velice důležitou roli v metabolismu řady léčiv jako je diklofenak nebo warfarin (Leemann et al 1993, Daniel et al 2006). Mezi hlavní cíle naší studie bylo zjistit, jak působí silymarin (extrakt ze semen Ostropestřce mariánského) na expresi a aktivitu cytochromu P450 2C6 u potkana trpícího hereditární hypertriglyceridemií (HHTg potkan) na definované hyperlipidemické dietě. Jako součást této diety byl po dobu 21 dnů podáván silymarin (1 % w/w). Metodou RT-PCR byla u těchto potkanů stanovena jaterní exprese mRNA CYP2C6. Následně byla stanovena i aktivita tohoto cytochromu P450.

Materiál a metody

Zvířata

Samci HHTg potkanů (280 – 300 g) byli rozděleni do 3 skupin (po 7 jedincích) a krmeni 3 týdny (*ad libitum*) experimentálními dietami. První skupině (kontrolní skupina) byla

podávána standardní dieta – STD, druhé skupina byla krmena standardní dietou obohacenou o cholesterol 1 % (w/w) (Sigma-Aldrich, Praha, ČR) a 10 % (w/w) vepřového sádla (HCD dieta). Třetí skupina byla na HCD dietě obohacené o 1 % (w/w) silymarinu. Po tomto krmném období 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 byly odebrány vzorky jater pro izolaci mikrosomů. Krevní plasma byla separována při 3000 otáčkách/min. (v rotoru s poloměrem 161 mm), 4°C, 20 minut.

Odborná etická komise MŠMT schválila projekt pokusů pro práci s těmito zvířaty.

Stanovení exprese CYP2C6 na úrovni mRNA

Asi 40 mg potkaních jater bylo stabilizováno v RNA-lateru (Quiagen, Germantown, USA) a následně homogenizováno (FastPrep, Qbiogene, Illkirch, Francie), RNA byla izolována za použití RNeasy Plus Minikit (Quiagen, Germantown, USA). Dále byla provedena reverzní transkripce 1 μg RNA pomocí Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Basel Švýcarsko). Vzniklá cDNA byla použita pro RT-PCR s využitím SYBR Green Master I Mix – Light Cycler 480 (Roche Basel Švýcarsko). Po každém cyklu byla monitorována a kvantifikována emise fluorescence. Odpovídající potkaní primery byly navrženy v naší laboratoři a následně syntetizovány (Invitrogen, Life Technologies, Praha). Měření probíhalo v tripletech. Byly použity následující primery:

CYP2C6 Fw 5'-GCCTTGTGGAGGAACTGAGG-3'

CYP2C6 Rev 5'-GCACAGCCCAGGATAAACGT-3'

Stanovení aktivity CYP2C6

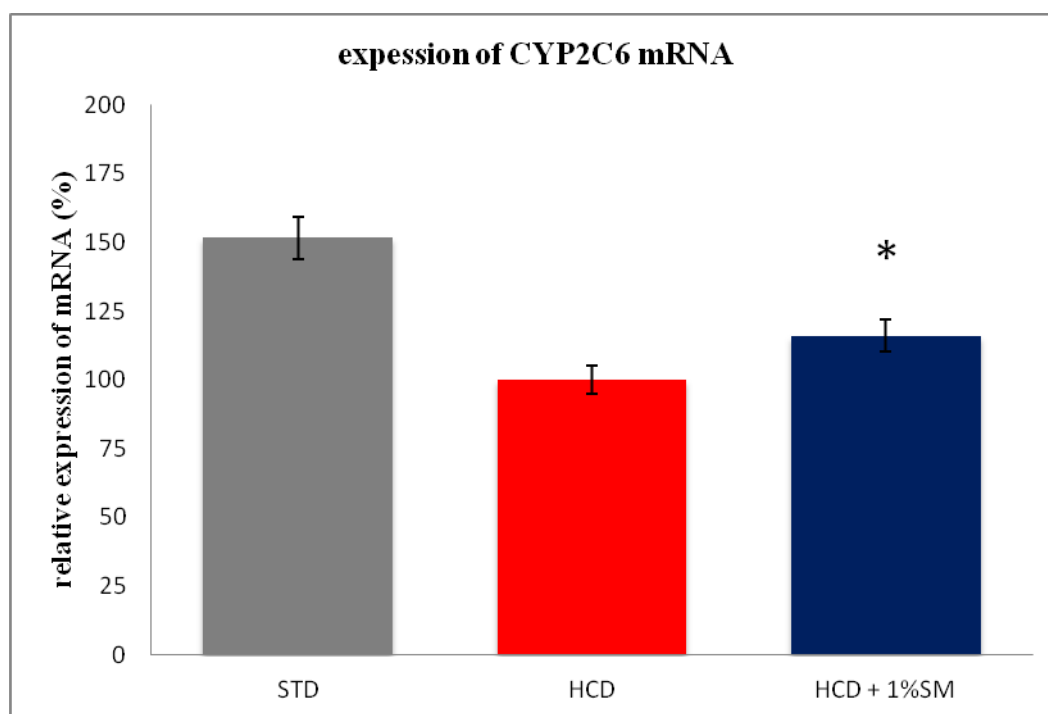
Ve vzorcích byl stanoven jak metabolit diklofenaku (4'-hydroxydiklofenak, formovaný hlavně enzymem CYP2C6 (Leeman et al 1993), tak i diklofenak (standarty od Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) metodou podle Crespi et al (2006). Analýzy byly provedeny za použití HPLC s UV detekcí při 280 nm (Shimadzu LC-20A Prominence, Kyoto, Japonsko). Metabolit byl separován na koloně LiChrospher 100 RP-18 (4 x 250 mm), s velikostí částic 5 μm (Merck Millipore, Darmstadt, Německo) při 50°C a průtoku 1 ml/min mobilní fáze s gradientovou elucí. Mobilní fáze A se skládala z 2 mM kyseliny chloristé ve vodě a acetonitrilu (7:3, v/v), mobilní fáze B byla 100% methanol.

Statistické zpracování

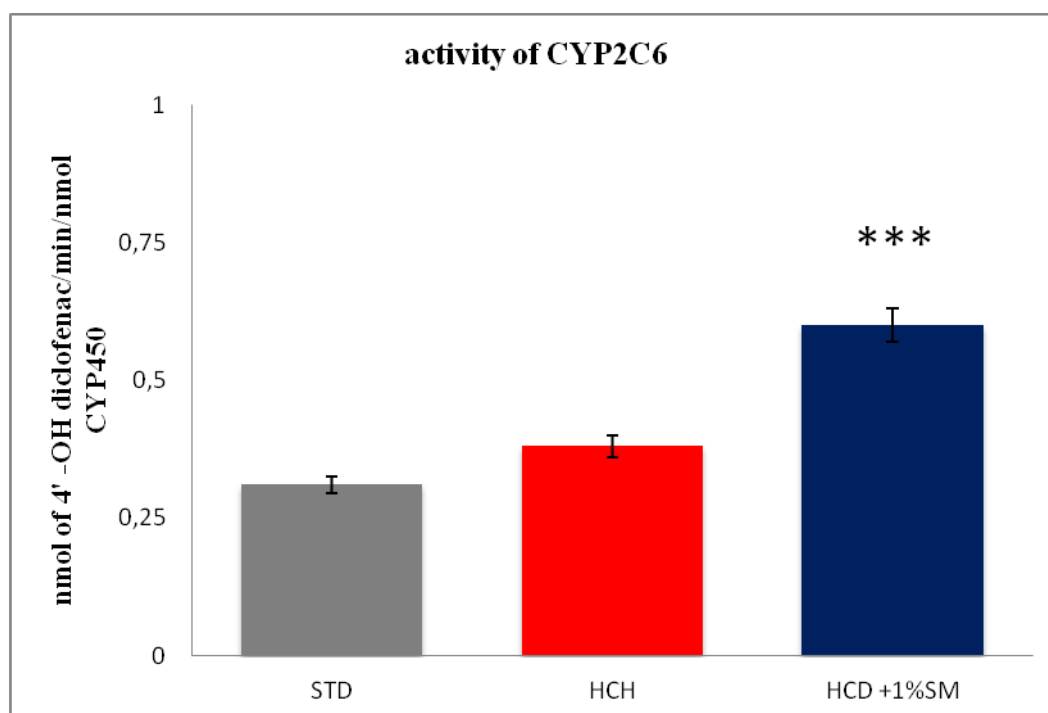
Všechna data jsou vyjádřena jako průměr \pm SE, n = 7. Pro statistické vyhodnocení uvedených výsledků byla použita ANOVA (Statistica 8, Praha, ČR).

Výsledky a diskuse

Silymarin v HCD dietě významně zvýšil (obr. 1) expresi CYP2C6 na úrovni mRNA. Obr. 2 ukazuje účinky tohoto extraktu na hydroxylační aktivitu námi sledovaného cytochromu P450. I zde je zřetelně patrné signifikantní zvýšení aktivity CYP2C6 u HHTg potkana na vysokocholesterolové dietě. Naše výsledky ukazují, že podávání silymarinu může pozitivně ovlivňovat tento cytochrom P450. Vzhledem k tomu, že je potkaní CYP2C6 v literatuře považován za protějšek lidského CYP2C9 (Daniel et al 2006) mohou být naše zjištění poměrně cenná. Recentní literatura uvádí, že silymarin má spíše inhibiční působení na cytochromy P450 (Doehmer et al 2011). Literární zdroje poukazují na možné lékové interakce se silybinem, což je hlavní komponenta extraktu silymarinu. Tento flavonolignan výrazně ovlivňuje účinek loratadinu působením na CYP3A4, což ukazuje, že současné užívání silybinu a loratadinu je třeba pečlivě sledovat pro možnost vzniku lékových interakcí (Li et al 2010). Naše výsledky o působení silymarinu byly získány na zvířecím modelu metabolického syndromu (HHTg potkan) poprvé. V literatuře jsou studie prováděny buďto na buněčné úrovni (lidské hepatocyty a podobně) nebo u zdravých experimentálních zvířat a nikoliv u jedinců s patologickým stavem organismu.



Obr. 1. Efekt standardní laboratorní diety (STD), vysokocholesterolové diety (HCD) a HCD se silymarinem (HCD + 1%SM) na expresi mRNA CYP2C6. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SE, $n=7$, * $P < 0,05$ vs HCD.



Obr. 2. Efekt standardní laboratorní diety (STD), vysokocholesterolové diety (HCD) a HCD se silymarinem (HCD + 1%SM) na aktivitu CYP2C6. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SE, $n=7$, *** $P < 0,01$ vs HCD.

Závěr

Naše výsledky ukazují, že silymarin významně zvýšil aktivitu a také expresi mRNA CYP2C6 v HHTg potkanů na vysokocholesterolové dietě. Tyto výsledky mohou naznačovat, že silymarin může mít potenciál ovlivnit hladiny současně užívaných léků. Interpretace námi získaných výsledků z hlediska jejich možného využití u člověka není jednoduchá. Bude třeba dalších studií pro objasnění působení silymarinu na cytochromy P450 u jedince s patologickým stavem organismu. Až teprve na základě těchto výsledků budeme moci vyhodnotit možnosti použití získaných informací i u člověka - pacienta.

Poděkování

Autoři děkují za finanční podporu grantu GAČR 13-10813S

Literatura

1. RAINONE F. Milk thistle. *Am. Fam. Physician* 2005; 72: 1285-1292.
2. ŠKOTOVÁ N., VEČEŘA R., URBÁNEK K., et al. Effects of polyphenolic fraction of silymarin on lipoprotein profile in rats fed cholesterol-rich diets. *Pharmacol Res* 2003; 47: 17-26.
3. DANIEL WA., HADUCH A., SYREK M., BOKSA J. Direct and indirect interactions between antidepressant drugs and CYP2C6 in the rat liver during long-term treatment. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006; 16: 580-587.
4. LEEMANN T., TRANSON C., DAYER P. Cytochrome P450TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. *Life Sci* 1993; 52: 29-34.
5. MO SL., ZHOU ZW., YANG LP., et al. New insights into the structural features and functional relevance of human cytochrome P450 2C9. Part I. *Curr Drug Metab* 2009; 10: 1075-1126.
6. VRÁNA A, KAZDOVÁ L. The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant Proc* 1990; 22: 2579.
7. CHARLTON M., KRISHNAN A., VIKER K., et al. Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 301: G825-G834.
8. DOEHMER J., WEISS G., MCGREGOR GP., APPEL K. Assessment of a dry extract from milk thistle (*Silybum marianum*) for interference with human liver cytochrome-P450 activities. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 21-27.
9. LI C, LEE MY, CHOI JS. Effects of silybinin, CYP3A4 and P-glycoprotein inhibitor in vitro, on the bioavailability of loratadine in rats. *Pharmazie* 2010; 65: 510-514.
10. CRESPI CL., CHANG TK., WAXMAN DJ. Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography. *Methods Mol Biol* 2006; 320: 109-113.

MOŽNOSTI ZNÍŽENIA ROZSAHU OXIDÁCIE TUKOV A OLEJOV POUŽITÍM PRÍRODNÝCH ANTIOXIDANTOV

POSSIBILITIES TO REDUCE THE EXTENT OF OXIDATION REACTIONS OF FATS AND OILS BY USING NATURAL ANTIOXIDANTS

M. Sabolová¹, D. Chrpová^{1,2}, I. Roubíčková¹, J. Pánek¹

¹*Department of Food Analysis and Nutrition, Institute of Chemical Technology, Prague*

²*Nursing College and Secondary Nursing School of 5th May, Prague*

Abstrakt

Oxidácia je jednou z najbežnejších reakcií, ku ktorým dochádza v tukoch a olejoch. Táto reakcia môže viesť k vzniku niektorých látok s nežiadúcim zdravotným efektom (hlavne aldehydov, ale aj cyklických mastných kyselín atď.). Boli sledované možnosti zníženia rozsahu oxidácie s použitím prírodných antioxidantov, ktoré sú verejnosťou lepšie akceptované než syntetické antioxidanty.

Na rozsah oxidácie má vplyv množstvo faktorov. Najvýznamnejšie sú stupeň nenasýtenosti tuku, teplota a prístup kyslíka. Tieto faktory ovplyvňujú aj účinnosť antioxidantov. Obvykle platí, že podmienky urýchľujúce oxidáciu, súčasne znižujú ich účinnosť. Vo všetkých prípadoch boli vybrané prírodné antioxidanty (rozmarín, šalvia, tymián a medovka a ich extrakty) schopné účinne inhibovať oxidačné reakcie prebiehajúce v tukoch a olejoch.

Abstract

Oxidation is one of the most common reactions in fats and oils. This reaction can lead to the formation of some compounds with harmful health effect (mainly aldehydes, but also cyclic fatty acids etc.). Natural antioxidants are more acceptable to the public than synthetic antioxidants. The possibilities reducing the extent of oxidation using natural antioxidants were observed.

The extent of oxidation affects many factors. The most important are the degree of unsaturation of fat, temperature and oxygen access. These factors also affect the effectiveness of antioxidants. Generally, the accelerative oxidizing conditions, at the same time reduce their effectiveness. In all cases the selected natural antioxidants (rosemary, sage, thyme and lemon balm and their extracts) are able to effectively inhibit oxidation reactions ongoing in fats and oils.

Introduction

Jedlé tuky a oleje hrajú významnú úlohu v ľudskej výžive a majú nezanedbateľný vplyv na zdravie človeka. V priebehu technologického spracovania a skladovania podliehajú tuky a oleje, rovnako ako potraviny obsahujúce tuk, rôznym chemickým zmenám. Jedná sa hlavne o oxidáciu lipidov, ktorá vedie k vzniku oxidačných produktov, z ktorých mnohé sú toxické a k zmenám senzorických a nutričných vlastností tukov (Langseth 1995, Reische et al. 1998, Gordon 2001). K oxidácii dochádza účinkom kyslíka, svetla, tepla, enzýmov a ďalších chemických a fyzikálnych faktorov. Aktivačná energia oxidácie výrazne klesá s počtom dvojitých väzieb v molekule triacylglycerolu, preto napr. oleje s vyšším obsahom linolenovej kyseliny oxidujú obvykle extrémne rýchlo. Ďalšími významnými faktormi urýchľujúcimi oxidačné procesy sú mimo iné stúpajúca teplota a prístup kyslíka. Jednou z možností ako oddialiť začiatok oxidácie alebo spomaliť jej priebeh je použitie antioxidantov. Aj napriek tomu, že sú syntetické antioxidanty v porovnaní s prirodzenými účinnejšie, lacnejšie a stabilnejšie, v súčasnej dobe sú viac používané prírodné antioxidanty z dôvodu jednoznačných preferencií konzumentov (Pokorný 2007). Niektoré prirodzené látky s antioxi-

dačným účinkom môžu pôsobiť škodlivo. Bezpečnosť mnohých týchto látok nebola potvrdená. Prírodné antioxidanty získané z rastlín majú obmedzené použitie, pretože môžu vykazovať vôňu po použitej rastline a meniť senzorické vlastnosti potraviny. (Frankel 1996, Frankel 2007, Reische et al. 1998).

Prírodné antioxidanty sú veľká a nesúrodá skupina hydrofilných a lipofilných zlúčenín, ktoré môžeme nájsť takmer vo všetkých rastlinách, mikroorganizmoch, hubách a v živočíšných tkanivách. Látky s antioxidačnými vlastnosťami sa nachádzajú vo všetkých častiach vyšších rastlín – drevo, kôra, stonky, listy, plody, korene, kvety, peľ, atď. Vysokú antioxidačnú aktivitu vykazujú extrakty bylín (rozmarín, šalvia, tymián), korenia (oregano, kurkuma), olejnatých semien (sezam, repka, ľan, sója, podzemnica) a čajov. Väčšina prírodných antioxidantov sú fenolové zlúčeniny a najdôležitejšiu skupinu tvoria tokoferoly, flavonoidy, fenolové kyseliny, fenolové terpeny, ďalej karotenoidy, askorbová kyselina atď. (Cuppet 1996, Frankel 1996, Frankel 2007).

K oxidácii nedochádza len v potravinách, ale aj v ľudskom organizme. Oxidácia je pre organizmus nevyhnutná k získaniu energie pre životné potreby. Ak je však oxidácia príliš rýchla alebo prebieha vo veľkom merítku (hovoríme o oxidačnom strese), voľné radikály vznikajúce v tele ako prirodzené produkty oxidačných reakcií môžu spôsobiť oxidáciu bunkových lipidov, čo je hlavný krok k rozvoju atherosklerózy a poškodeniu DNA. Biochemické štúdie ukazujú, že oxidačné poškodenie tkanív (vyvolané dlhodobým oxidačným stresom) vedie k rozvoju niektorých ochorení (kardiovaskulárne choroby, rozvoj rakoviny, vznik a komplikácie diabetu, Parkinsonova choroba, apod.) a uplatňuje sa v procese stárnutia organizmu. Podobné zlúčeniny vznikajú i v potravinách a po resorpcii môžu negatívne pôsobiť v organizme, v prípade neresorbiteľných zlúčenín v čreve (Block 1994, Langseth 1995, Rock 1996, Pokorný 1999). Prírodné antioxidanty majú dôležité funkcie v rastlinách aj v ľudskom organizme (Grassmann 2005). Antioxidačné zložky rastlín môžu hrať určitú úlohu v udržiavaní zdravia a prevencii pred kardiovaskulárnymi a nádorovými chorobami. Majú schopnosť chrániť telo pred voľnými radikálmi vznikajúcimi pri oxidačnom strese (Khalil 2007).

Materials and Methods

Chemikálie a rozpúšťadlá požadovanej čistoty.

α – tokoferol (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA), propylgallát (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA).

Bylinný materiál. Medovka lekárska (*Melissa officinalis* L.), šalvia lekárska (*Salvia officinalis* L.) a tymián obyčajný (*Thymus vulgaris* L.) boli vypestované v lokalite Kolínsko (50;2'0.168'N, 15°21'39.921'E, 282 m.n.m) v hlinitopiesčitej mierne priepustnej pôde, bez prihnojovania. Listy medovky boli zbierané na prelome júna a júla 2011, vek rastliny 12 rokov. Zber listov šalvie a tymiánu sa uskutočnil koncom septembra 2012, vek rastlín 13 rokov. Listy boli sušené voľne v tieni, vo vetranej miestnosti, pri teplote okolia.

Zemiaky konzumné neskoré šalátové (odroda Princess), Krajina pôvodu: ČR.

Sadlo. Výrobca: Masokombinát Plzeň, Česká republika. U použitého sadla bolo stanovené peroxidové číslo, ktorého hodnota bola 0,56 miliekvivalentu aktívneho kyslíka/1 kg.

Repkový olej LUKANA (jednodruhový, nízkoerukový), Usti oils, s.r.o., ČR; **Repkový olej**, high oleic, výrobca Cargill, UK; **Palmojadrový tuk**, výrobca Karlsham, Švédsko.

Vodný extrakt medovky Čerstvé a sušené listy medovky boli extrahované dvakrát 50 ml vriacej vody (10 minút vo vodnom kúpeli 70 °C) na 2 g byliny. Potom bol extrakt sfiltrovaný a odparený na rotačnej vakuovej odparke pri teplote 50 °C a potom rozpustený v diethyletheru a doplnený na objem 25 ml.

Diethyletherový extrakt medovky, šalvie a rozmarýnu. Byliny sa extrahovali pomocou 3x100 ml diethyletheru v ultrazvukovom kúpeli po dobu 3x20 minút. Extrakt sa sfiltraval a odparil na rotačnej vakuovej odparke pri teplote 30°C.

Komerčný extrakt rozmarýnu Naturox 100 tekutý, výrobca TRUMF International s.r.o., ČR.

Schaalov test. Metoda je založená na sledovaní prírastku hmotnosti tuku, ku ktorému dochádza pri oxidácii v dôsledku hromadenia hydroperoxidov. Tuk je oxidovaný za mierne zvýšenej teploty (60°C), voľného prístupu kyslíka a bez prístupu svetla (Joynes a kol 1983, Rossell 1994). Oxidácia bola sledovaná sadle resp. oleji bez/s pridaním antioxidantov (medovka, šalvia). Pre porovnanie boli pripravené vzorky s α -tokoferolom a propylgallátom – pozitívne štandardy. Z nameraných hodnôt bola metódou lineárnej regresie stanovená dĺžka indukčnej periódy (IP), ktorá nám udáva stabilitu tuku pri skladovaní. Následne bol z IP vypočítaný protekčný faktor (PF), podľa vzorca $PF = (IP_{tuk + antioxidant}) / (IP_{tuk})$, ktorý určuje aktivitu antioxidantu.

Stanovenie obsahu tokoferolov. Obsah tokoferolov bol stanovený metódou vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou v reverznej fáze s amperometrickou detekciou, detekčný potenciál

+ 1,05 V (Trojaková 2001).

Stanovenie obsahu polymerných triacylglycerolov (TAG). Polymerné TAG sa stanovili metódou gelovej permeačnej chromatografie (HPSEC) s refraktometrickou detekciou (Rěblová 1998).

Skladovanie tepelne namáhaného oleja. Na repkovom oleji bez prídavku antioxidantov a s prídavkom vybraných antioxidantov sa usmažila jedna porcia hranoliek (100 g; dopredu umytých a osušených) pri teplote 180°C. Následne sa olej nechal vychladnúť a v prípade použitia bylín sa sfiltraval. Pre Schaalov test bolo navážených 25 g oleja do 100 ml kadičiek (20 mm vrstva oleja). **Opakované smaženie.** Smaženie hranoliek prebiehalo po dobu 15 dní (za rovnakých podmienok ako u predchádzajúceho experimentu). V jednoduchých intervaloch (vždy pred nasledujúcim smažením) sa odoberal vzorok oleja, v ktorom sa následne stanovil obsah tokoferolov a obsah polymerných TAG.

Results

Vplyv nasýtenosti tuku / oleja na jeho oxidačnú stabilitu a účinnosť antioxidantov.

Jednotlivé tuky a jedlé oleje majú rôzne zloženie mastných kyselín (viz tab.1 a tab.2) a to ovplyvňuje ich stabilitu pri technologickom spracovaní a skladovaní a účinnosť antioxidantov. Vplyv stupňa nenasýtenosti tuku (oleja) na jeho stabilitu (dĺžku IP) pri skladovaní za podmienok Schaalovho testu (60°C, voľný prístup kyslíka, tma) je znázornený v tab.3. Komerčný extrakt rozmarýnu je schopný zabrániť oxidácii a predĺžiť indukčnú periódu sadla a repkového oleja. Ak má bylina rovnakú alebo vyššiu schopnosť stabilizovať tuk ako α -tokoferol (používaný ako pozitívna kontrola), môžeme ju považovať za účinný antioxidant.

Tabuľka 1. Obsah nasýtených, monoénových a polyénových mastných kyselín v sadle a vybraných olejoch (% všetkých mastných kyselín) (Velíšek a Hajšlová 2009)

Table 1. Content of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in lard and selected oils (% all fatty acids) (Velíšek and Hajšlová 2009)

Druh tuku	Kyseliny		
	nasýtené	monoénové	polyénové
Sadlo	25 - 70	37 - 68	4 - 18
Repkový olej	5 - 10	52 - 76	40 - 62
Slniečnicový olej	9 - 17	13 - 41	42 - 74
Olivový olej	8 - 26	54 - 87	4 - 22
Ľanový olej	10 - 12	18 - 22	66 - 72
Sezamový olej	13 - 18	36 - 44	42 - 88
Sojový olej	14 - 20	18 - 26	55 - 68
Ryžový olej	19 - 35	42 - 50	16 - 37

Tabuľka 2. Zloženie hlavných mastných kyselín sadla a vybraných olejov (% všetkých mastných kyselín) (Velíšek a Hajšlová 2009)

Table 2. The fatty acid composition of lard and selected oils (Velíšek and Hajšlová 2009)

Mastná kyselina	Sadlo	Olivový olej	Slniečnicový olej	Repkový olej (kanola - bezerukový)
Myristová	0,5 - 2,5	0,0 - 0,1	0,0 - 0,2	0,0 - 0,2
Palmitová	20 - 32	7,5 - 20	5,0 - 8,0	3,3 - 6
Stearová	5 - 24	0,5 - 5	2,5 - 7,0	1,1 - 2,5
Palmitoolejová	1,7 - 5	0,3 - 3,5	< 0,5	0,1 - 0,6
Olejová	35 - 62	55 - 83	13 - 40	52 - 67
Linolová	3 - 16	3,5 - 21	40 - 70	16 - 25
Linolénová	< 1,5	0,0 - 1,5	< 0,3	6,4 - 14,1
Arachová	< 1,0	0,0 - 0,8	< 0,5	0,2 - 0,8

Tabuľka 3. Stabilita vybraných tukov a olejov bez/s pridaním antioxidantu za podmienok Schallovho testu

Table 3. Stability of selected fats and oils without/with addition of antioxidant under the Schaal test condition

Druh tuku (+ antioxidant)	IP	PF
Repkový olej	9,2	X
Repkový olej (HO)	26,8	1
Repkový olej (HO) + KER	41,7	1,6
Palmojadrový tuk	54,4	X
Sadlo	11,8	1
Sadlo + tokoferol (1g/kg)	28,0	2,4
Sadlo + KER (1 g /kg)	56,1	4,8
Sadlo + DER (6,25 g/kg)	112,6	9,5
Sadlo + DER (12,5 g/kg)	153,6	13,0

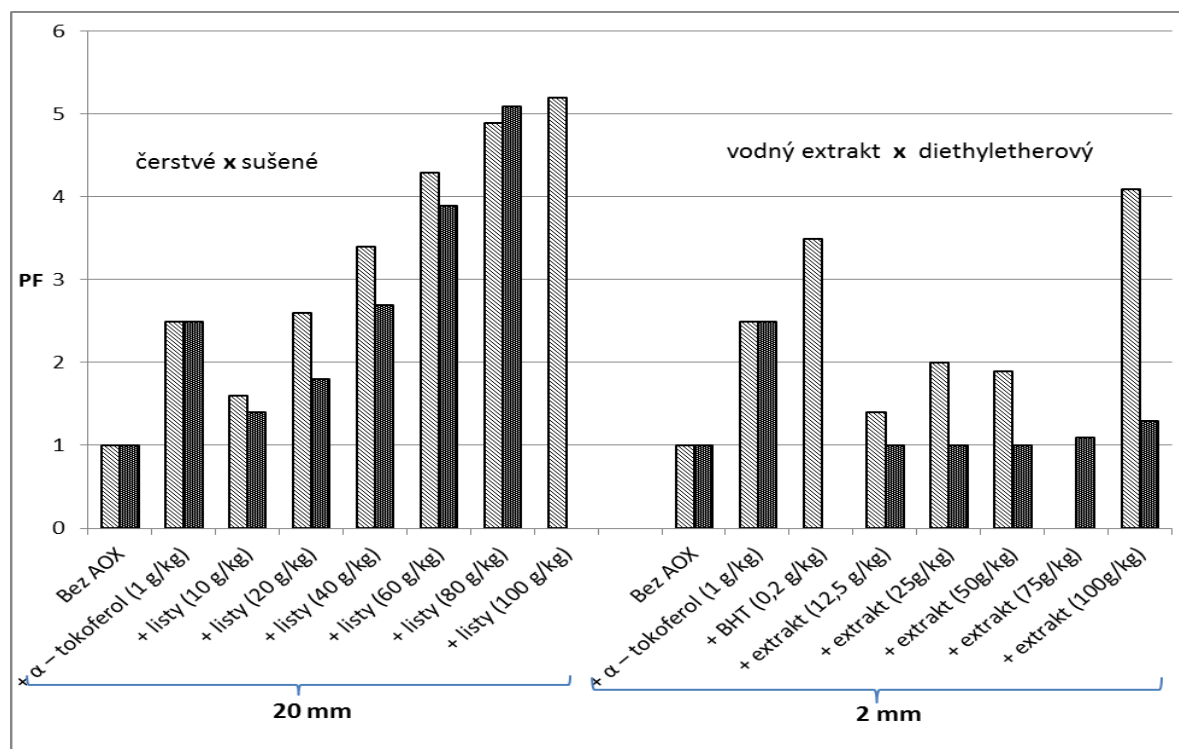
HO high oleic, KER komerčný extrakt rozmarýnu, DER diethyletherový extrakt rozmarýnu

Vplyv prístupu kyslíka do tuku / oleja na účinnosť antioxidantov.

Listy medovky lekárskej priamo použité v sadle významne inhibujú jeho oxidáciu (obr. 1). Prístup kyslíka ovplyvnil stabilitu sadla s pridaním medovky. V prípade tenkej vrstvy (2 mm) je protekčný faktor viac ako o 1 menší než v prípade 20 mm vrstvy sadla. Rozdiel môže byť daný lepším prístupom kyslíka do oleja a odlišnou aplikáciou antioxidantu (vodný a diethyletherový extrakt)

Obrázok 1. Antioxidačná schopnosť medovky lekárskej v sadle (vrstva 2 a 20 mm)

Figure 1. Antioxidant capacity of lemonbalm in lard (layer of lard 2 or 20 mm)

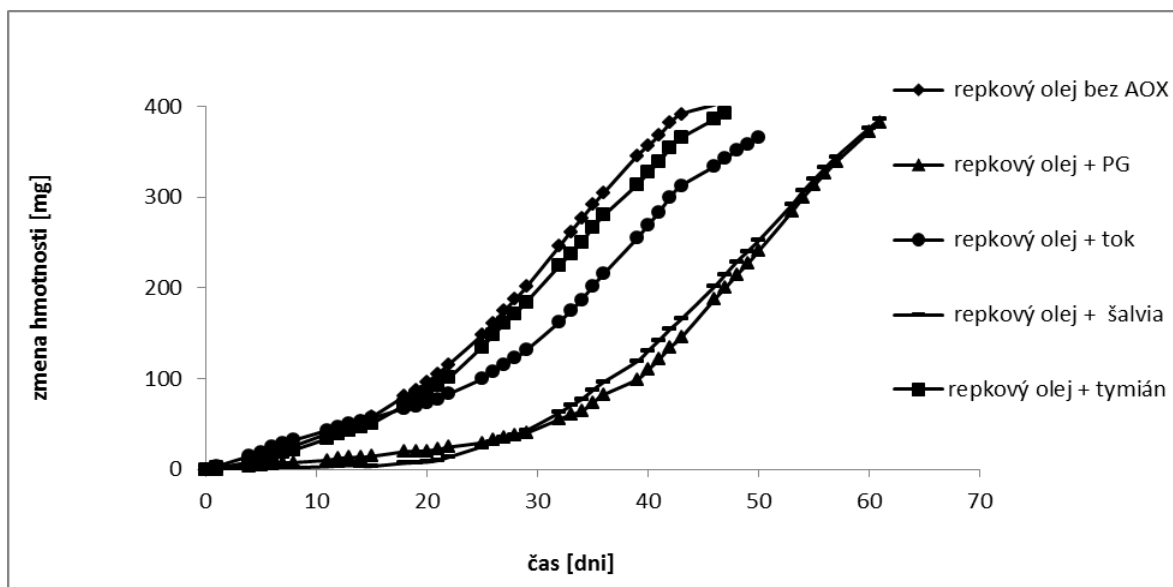


AOX...antioxidant

Účinnosť antioxidantov pri smažení - skladovanie smažiaceho oleja.

Tento typ pokusu imituje smaženie v domácnostiach. Pri teplotách pod 100 °C funguje normálne väčšina antioxidantov, ich funkcia je však obmedzená pri teplotách smaženia (160°C – 180°C). Napriek nižšej účinnosti má sušená šalvia v množstve 10 g/kg pozitívny vplyv na stabilitu tepelne namáhaného oleja porovnateľnú s propylgallátom (syntetický antioxidant). Sušený tymián je neúčinný viz obr. 2.

Obrázok 2. Oxidačná stabilita repkového oleja po jednom smažení
Figure 2. Oxidative stability of rapeseed oil after single frying

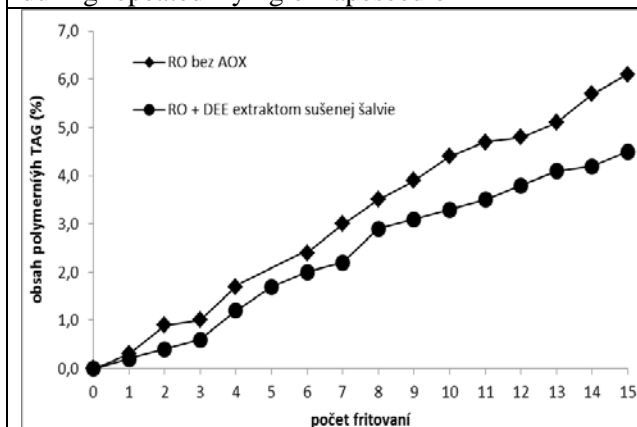


AOX...antioxidant, PG...propylgallát, tok... α -tokoferol

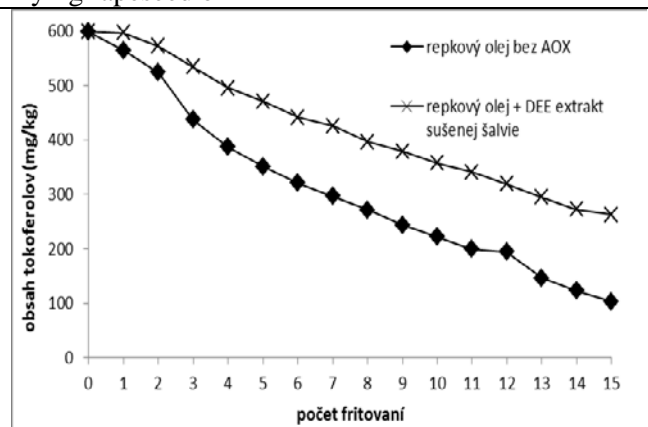
Účinnosť antioxidantov pri smažení - opakované smažení.

Tento typ pokusu imituje smažení vo veľkom merítke napr. v podnikoch rýchleho občerstvenia. Diethyletherový extrakt sušenej šalvie významne inhiboval straty tokoferolov repkového oleja a tvorbu polymerných TAG v priebehu opakovaného smažení viz obr. 3 a obr. 4. Aj za ideálnych experimentálnych podmienok je úbytok tokoferolov veľmi rýchly, keďže ich radikály mastných kyselín vznikajúce pri smažení degradujú viz obr. 4. Za normálnych okolností môže byť už po treťom smažení obsah tokoferolov nulový.

Obrázok 3. Nárast obsahu polymerných TAG v priebehu opakovaného smažení repkového oleja
Figure 3. Increase the content of polymeric TAG during repeated frying of rapeseed oil



Obrázok 4. Úbytok obsahu tokoferolov v priebehu opakovaného smažení repkového oleja
Figure 4. Losses of tocopherols during repeated frying rapeseed oil



Discussion

Na stabilitu tukov a olejov používaných na smažení ma vplyv mnoho faktorov. Medzi jedny z najvýznamnejších patria: nenasýtenosť mastných kyselín, teplota a prístup kyslíka. So zvyšujúcim sa stupňom nenasýtenosti tuku sa stráca účinnosť antioxidantov, tzn. prírodné antioxidanty sú účinnéjšie v sadle než v oleji. Extrakt šalvie, ktorý patrí medzi najstaršie a najúčinnéjšie antioxidanty používané ku stabilizácii tukov je veľmi aktívny v sadle a tukoch

živočišného pôvodu, ale menej aktívny v jedlých rastlinných olejoch, ktoré ťažko stabilizuje, pretože vysoká iniciačná rýchlosť autooxidácie závisí na vysokom obsahu nestabilných polynenasýtených mastných kyselín (Pokorný 1999, Frankel 2007). U ďalších antioxidantov (prirodzených i syntetických) je táto závislosť ešte markatnejšia. U jednotlivých jedlých olejov je dôležitý nielen pomer nasýtených, mononenasýtených a polynenasýtených mastných kyselín, ale aj prítomnosť a obsah vysoko nenasýtených mastných kyselín, u ktorých je aktivačná energia radikálovej reakcie veľmi nízka. Repkový olej obsahuje okolo 30 % linolovej a 10 % linolenovej kyseliny, na druhej strane slnečnicový olej má až 70 % linolovej kyseliny a len stopové množstvo linolenovej kyseliny. Aj napriek tomu, že repkový olej obsahuje menej polynenasýtených mastných kyselín než slnečnicový olej, ich stabilita je porovnateľná, a to vďaka prítomnosti linolenovej kyseliny v repkovom oleji. U klasického Schallovho testu je slnečnicový olej menej stabilný, ale pri smažení je stabilita slnečnicového a repkového oleja porovnateľná.

Schopnosť antioxidantov inhibovať oxidáciu tuku klesá nielen s jeho stupňom nenasýtenosti, ale aj so zhoršujúcimi sa podmienkami jeho použitia. Jedná sa hlavne o teplotu, ktorej je tuk vystavený a prístup kyslíku.

Miera oxidácie tukov a olejov je ovplyvnená parciálnym tlakom kyslíka, stupňom nenasýtenosti mastných kyselín, prítomnosťou svetla, teplom, antioxidantami a prooxidantami (Cu, Fe, pigmenty). Rozpustnosť kyslíku je v oleji 3 – 5 krát vyššia než vo vode (Gunstone and Przybylski 2011). Rýchlosť absorpcie kyslíka je väčšia pri zväčšení styčnej plochy oleja so vzduchom, napríklad pri penení oleja. Pri penení oleja dochádza k rýchlejšej oxidácii oleja a súčasne ku zvýšeniu rozsahu jeho hydrolýzy. Hydrolýzou vznikajúce voľné mastné kyseliny sú viac náchylné k oxidácii než mastné kyseliny viazané v TAG. V rýchlosti oxidácie voľných a viazaných mastných kyselín môže byť aj rádový rozdiel.

Smaženie je kulinárna úprava v horúcom oleji (160 – 180°C aj viac) za súčasného prenosu tepla a hmoty. Ako sa prenáša teplo z oleja do potravín, tak sa voda odparuje z potraviny a olej je potravínou absorbovaný. Smažené potraviny obsahujú v niektorých prípadoch až 35 % tuku. Podľa Marmesata (2010) je ochranný účinok prirodzených antioxidantov pri smažení veľmi variabilný. Závisí na jejich zložení a koncentrácii a na podmienkach smaženia (napr. teplote), stupni nenasýtenosti oleja a na obsahu a chemickej štruktúre minoritných zložiek oleja (tokoferolov, fosfolipidov, karotenoidov, minerálnych látok ai.). V priebehu smaženia sa oleje oxidujú za vzniku prchavých a neprchavých monomerných a polymerných zlúčenín (Akoh and Min 2002). Oxidačné produkty linolovej a linolenovej kyseliny sú hlavnými faktormi vzniku „smaženej“ chuti (Gunstone and Przybylski 2011). Potraviny smažené pri optimálnej teplote a čase majú zlatavo hnedú farvu, sú chrumkavé a olej absorbujú optimálne. Potraviny smažené pri nižšej teplote alebo kratšiu dobu majú bielu alebo mierne hnedú farvu na okraji a v strede je čiastočne varený škrob. Tieto potraviny nemajú dobrú farvu, chrumkavú texturu a žiaducu smaženú chuť. Presmažené potraviny pri vyššej teplote a dlhšej dobe smaženia než je optimálne majú tmavo hnedú až čiernu farvu. Sú tuhé a mastné v dôsledku nadmernej absorpcie oleja. (Akoh and Min 2002, Choe and Min 2007). Pri vyšších teplotách sa naviac extrémne zvyšuje rozsah tvorby karcinogenného akrylamidu. Prídavok antioxidantov a odpeňovacích emulzií môže pomôcť udržať kvalitu oleja, ale účinnosť antioxidantu vždy klesá s vysokou teplotou fritovania (Choe and Min 2007, Kmiecik et al. 2009).

Tokoferoly sú prirodzene sa vyskytujúce antioxidanty rastlinných olejov, ktoré majú pozitívny vplyv na oxidačnú stabilitu olejov (Rossi et al. 2007) a sú dôležité v organizme ako vitamín E. Dĺžka smaženia ovplyvňuje oxidáciu a straty tokoferolov. Dôležitým faktorom je hlavne teplota smaženia, ktorá by mala byť maximálne 170 – 180°C, pretože pri teplotách nad 200°C sa tokoferoly degradujú takmer okamžite. Šalvia pridaná do repkového oleja má

schopnosť inhibovať straty tokoferolov a vznik polymerných triacylglycerolov, čo je v súlade s literárnymi údajmi (Takácsová et al. 1995, Réblová and Okrouhlá 2010).

Za bežne používaných podmienok smaženia sú straty tokoferolov veľké a rýchle. Podobne je to aj s obsahom polymerných TAG, ktoré rýchlo dosiahnu hodnoty 12 % obsahu, ktorá je považovaná za limitnú a pri jej presiahnutí je potrebné olej vymeniť. Obsah polymerných TAG je priamo úmerný teplote a času smaženia a menej závislý na zložení mastných kyselín (Akoh and Min 2002, Dana and Sagui 2001).

Conclusions

Prírodné antioxidanty majú schopnosť znížiť rozsah oxidácie tukov a olejov, a tým zamedziť vzniku zdraviu škodlivých látok. Rýchlosť oxidácie je ovplyvnená mnohými faktormi a prírodné antioxidanty sú schopné efektívne inhibovať oxidáciu aj napriek pôsobeniu všetkých týchto faktorov, či už sa jedná o stupeň nenasýtenosti tuku a oleja, teplotu alebo prístup kyslíka.

Acknowledgment

Financované z projektu MŠMT 6046137305.

References

- AKOH CC., MIN DB. Food Lipids - Chemistry, Nutrition and Biotechnology. CRC Press, USA 2002, 1014 s.
- BLOCK G., LANGSETH L. Antioxidant vitamins and disease prevention. Food Technology 1994; 48: 80-85.
- CUPPET S., SCHNEPF M., HALL C. Natural antioxidants-are they really? In: Natural antioxidants: chemistry, health effect and applications. Shahidi F. Ed. Champaign Ill., AOAC Press 1996, 13- 23.
- DANA D., SAGUI IS. Frying of nutritious foods: obstacles and feasibility. Food Sci Technol Res 2001; 7: 265-279.
- FRANKEL EN. Antioxidants in lipids and their impact on food quality. Food Chemistry 1996; 57: 51-55.
- FRANKEL EN. Antioxidants in Food and Biology. Bridgewater, UK, The Oily Press 2007.
- GORDON MH. The development of oxidative rancidity in foods. In: Antioxidants in food. Pokorný J., Yanishlieva N., Gordon MH., Eds. Cambridge England, Woodhead Publishing 2001, 7-20.
- GRASSMANN J. Terpenoids as Plant Antioxidants. Plant Hormones 2005; 72: 505-535.
- GUNSTONE FD., PRZYBYLSKI R. Canola/Rapeseed Oil. In: Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses, 2nd Ed. Wiley-Blackwell Publishing Ltd. 2011, 107-136.
- CHOE E., MIN DB. Chemistry of deep-fat frying oils. J Food Sci 2007; 72: 77-88.
- JOYNER NT., MCINTYRE JE. The oven test as a index of keeping quality. Oil & Soap 1938; 15: 184-186.
- Khalil MY., Moustafa AA., Naguib NY. Growth, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Some Medicinal Plants Grown under Organic Farming Condition. W J Agric Sci 2007; 3: 451-457.
- KMIECIK D., KORZAK J., RUDZINSKA M., et al. Stabilization of phytosterols in rapeseed oil by natural antioxidants during heating. Eur J Lipid Sci Technol 2009; 111: 1124-1134.
- LANGSETH L. Oxidants, Antioxidants and Disease Prevention. ILSI European, Brussels (Belgium) 1995, 24 s.
- MARMESAT S., MORALES A., VELASCO J., DOBARGANES C. Action and fate of natural and synthetic antioxidants during frying. Grasas y Aceites 2010; 61: 333-340.

- POKORNÝ J. Are natural antioxidants better and safer - than synthetic antioxidants? *Eur J Lipid Sci Technol* 2007; 109: 629-642.
- POKORNÝ J. Antioxidants in Food Preservation. In: *Handbook of Food Preservation*. Rahman MS. Ed. New York, Basel, M. Dekker 1999, 309-337.
- RÉBLOVÁ Z. Degradace lipidů za vysoké teploty. *Disertační práce VŠCHT Praha*, 1998.
- RÉBLOVÁ Z., OKROUHLÁ P. Ability of phenolic acid to protect α -tocopherol. *Czech J Food Sci* 2010; 28: 290-297.
- REISCHE DW., LILLARD DA., EITENMILLER RR. Antioxidants. In: *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*. Akoh CC., Min DB. Eds. New York, Marcel Dekker 1998, 423-447.
- ROSSELL JB. Measurement of Randicity. In: *Randicity in Foods*. Allen JC., Hamilton RJ. Ed. New York, Champan & Hall 1994, 22-53.
- ROSSI M., ALAMPRESE C., RATTI S. Tocopherols and tocotrienols as free radical-scavengers in refined oils and their stability during deep-fat frying. *Food Chemistry* 2007; 102: 812-817.
- TAKÁCSOVÁ M., PRÍBELA A., FAKTOROVÁ M. Study of the antioxidative effects of thyme, sage, juniper and oregano. *Die Nahrung* 1995; 39: 241-243.
- TROJÁKOVÁ L. Studium vybraných přírodních antioxidantů. *Disertační práce VŠCHT Praha*, 2001.
- VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J. *Chemie potravin*. Tábor, Osis 2009.

IMPORTANCE OF EPICARDIAL ADIPOSE TISSUE MEASURING AND ITS ASSOCIATION WITH CARDIOMETABOLIC RISK FACTORS IN OBESE AND NORMAL WEIGHT CHILDREN

I. Schusterova, J. Šaligová, Ľ. Potočnáková, M. Kuchta

II. department of pediatric and adolescent's medicine, Medical Faculty, P.J. Safarik University and Children Faculty Hospital, Tr. SNP No.1, Košice, Slovakia

Abstract

Epicardial adipose tissue (EAT) is the visceral fat deposit around the heart and is commonly increased in obese subjects. EAT is related to cardiometabolic risk factors and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in adults, but this relationship is not well known in children.

In 25 (mean age 13.0 \pm 2.3) overweight and obese subjects and 24 lean controls, blood pressure (BP), WC, fasting plasma glucose and insulin, lipids, uric acid and hepatic enzymes were established and EAT thickness measured by transthoracic echocardiography. In overweight and obese subjects, EAT was significantly higher compared to normal weight children. Overweight and obese children had significantly higher body mass index (BMI), WC, BP, triglycerides (TAG), low-density lipoprotein and total cholesterol, hepatic enzymes alanine aminotransferase (ALT) and g-glutamyl transferase, and lower high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). EAT correlated significantly with BP, TAG, uric acid, HDL-C, apoprotein B and ALT. Correlation coefficients were similar or better than for WC, but similar or lower than for BMI. Conclusion: EAT thickness in children is associated with an unfavorable cardiometabolic risk profile including biochemical signs of NAFLD and hyperuricaemia, but is not a stronger indicator than BMI.

Introduction

The thickness of epicardial adipose tissue (EAT) as measured by echocardiography represents an independent predictor of visceral adiposity. A very good positive correlation was found between echocardiographic measurements of EAT and magnetic resonance imaging (MRI) measurements, which represent the gold standard for assessing visceral fat mass (1,2). Echocardiographically determined EAT as an expression of the visceral adipose tissue quantity and its correlation with traditional cardiometabolic risk factors, has been studied in several adult populations (3,4); however, only a few studies have been conducted in paediatric populations (5,6). In adult subjects, a close correlation was found between visceral fat, including EAT, metabolic syndrome (MS), insulin resistance (IR) and NAFLD markers (1,4,7). This has not yet been examined in children, despite the evidence that NAFLD and MS also occur in children (8,9). There are several studies in adults demonstrating the correlation between visceral fat and uric acid levels (10,11), but none in children.

Study groups and methods

25 overweight and obese subjects (13.0 \pm 2.3 years) with BMI \geq 85th percentile for age and gender were included in the study and were compared with 24 lean healthy subjects (12.9 \pm 3.4). Waist circumference (WC) were measured according to WHO (12) and blood pressure (BP) according to the ESH recommendations (13). Plasma glucose, serum triglycerides (TAG), total cholesterol and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, lowdensity lipoprotein (LDL) cholesterol, fasting serum insulin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), g-glutamyl transferase (gGT), alkaline phosphatas (ALP), uric acid and total proteins, apoprotein A1 (ApoA1), and apoprotein B (ApoB) and homocystein were measured in laboratory analysis. The homeostasis model assessment of

insulin resistance (HOMA index) was calculated according to the standard formula (23). For the diagnosis of I IR, 3.16 was used as the cut-off value. Presence of MS was determined according to IDF 2007 criteria (14). The EAT was identified according to Iacobellis et al. (1). In statistics data were processed using methods of descriptive and inductive statistics and the significance level was set to the traditional $P < 0.05$. The one-dimensional analysis – the tabulation of all monitored variables using frequency tables and than was used a two-dimensional analysis – the assessment of pairs of monitored variables, analysis of variance was used to determine the statistical significance of differences, if the distribution of variables was normal, multidimensional analysis – a multiple linear regression analysis, where the relationship between several numerical variables was examined simultaneously.

Results

The anthropometric and clinical and biochemical parameters of the study and control groups and the statistically significance differences are reported in Table 1 The average thickness of EAT at the end of systole (sEAT), diastole (dEAT) and mean EAT (average value of systole and diastole) on the wall of the right ventricle were significantly higher in overweight and obese children (sEAT-0.65 mm; dEAT-0.36 mm; mean EAT -0.50 mm) compared to EAT thickness in normal weight children (sEAT-0.51 mm; dEAT 0.16 mm; mean EAT-0.23 mm) ($p < 0.001$). Simple linear regression analysis of mean EAT with reported significant positive correlations with anthropometric clinical and biochemical parameters showed Table 2. The same pattern was noted for EAT in parasternal long and short axis in systole, EAT in parasternal long and short axis in diastole and mean EAT, and only correlations for mean EAT are presented in Table 2. Multiple regression analysis showed that after adjusting for BW, BMI, BMI percentile, WC and systolic and diastolic BP, TAG was the only metabolic marker correlating with EAT (Table 3). As shown in Table 4, EAT was a better metabolic predictor than WC, but BMI showed a similar predictive value as EAT. The plasma insulin and HOMA index values were significantly higher in the overweight and obese subjects, whereas fasting serum glucose did not significantly differ between these two groups (Table 1). There was no significant correlation between the HOMA index and EAT (Table 2). No significant differences for mean EAT were found between obese subjects with ($n = 9$) and without MS ($n = 13$): 0.54 ± 0.18 vs. 0.48 ± 0.13 cm, respectively ($P = 0.39$); or with ($n = 8$) and without ($n = 9$) insulin resistance: 0.49 ± 0.11 vs. 0.46 ± 0.12 cm, respectively ($P = 0.27$). To compare with other studies in children, diastolic EAT in children with and without MS also did not differ: 0.39 ± 0.10 vs. 0.34 ± 0.09 cm ($P = 0.34$).

Discussion

The echocardiographic determination of EAT was first introduced by Iacobellis et al. (1). The echocardiographic measurement of EAT provides excellent reliability comparable to MRI measured epicardial and visceral fat (2,15) and as an expression of the quantity of visceral adipose tissue has been studied in adult populations (2,3), but only a limited number of studies have been published in children (5,6,16). In our group of subjects, age and gender did not correlate with EAT, similar to the study by Mazur et al. (5), whereas Abaci et al. (6) reported a correlation between EAT and age, possibly reflecting the larger age range in that study. Consistent with previous pediatric studies (5,6,26), a significantly higher thickness of echocardiographic EAT was found in overweight and obese children and there is a strong correlation of EAT with both BMI and WC. In contrast, in adults epicardial fat is increased with increased WC but not with BMI (4). WC is still the most practical and widely used marker of visceral fat and cardiometabolic risk predictor, but compared to the measurement of EAT this method has poor sensitivity and specificity (16). Recent studies showed that WC is not more strongly associated with cardiovascular risk factors than BMI and both have the

same power to predict MS in children (17,18). However, for development of MS in early adulthood, childhood WC was the strongest predictor in the study by Schmidt *et al.* (19). In the present study, we compared three different indicators of the severity of obesity. EAT seems to be a better metabolic predictor than WC but surprisingly BMI showed a similarly predictive value as EAT. Even the correlations between EAT and metabolic variables were possibly mediated by BMI. In obese adults, increased body fat plays a primary role in increased BW. In childhood obesity, body growth and development are important additional factors to consider. Our study suggests that BMI is a reliable method to assess the metabolic impact of obesity in the growing organism and that measurement of epicardial fat may not offer an advantage compared to BMI for the assessment of metabolic impairment. Iacobellis and Leonetti (3) first reported that in adults, the thickness of echocardiographic EAT significantly correlates with insulin resistance. In children, however, the association between insulin resistance and EAT is still controversial. In our study, similar to other paediatric studies (5,6), we did not confirm this relationship, whereas a study by Ozdemir *et al.* (16) did show a relationship. Gender, obesity and pubertal status are factors affecting IR, and the IDF definition of MS fails to identify individuals with IR (20). In spite of the uncertainty about the association of EAT and IR and MS in children, Abaci *et al.* (6) proposed that the value of 4.1 mm may represent an EAT limit that can be used to predict insulin resistance. In the study of Mazur *et al.* (5), this value was close to the 95th percentile for EAT which was 3.9 mm. In our study, the value of 3.9 mm was the average value for EAT in children with MS. NAFLD is caused by the excessive accumulation of fat in the liver. Obesity, IR and MS are closely associated with NAFLD (21). Iacobellis *et al.* (1) were the first to emphasize the relationship between echocardiographically measured EAT and visceral adiposity with AST and ALT values as markers of hepatic steatosis and increased ALT can be considered a NAFLD marker. Our study shows a positive correlation between EAT and ALT in obese children whose ALT was significantly elevated although not to pathological values. This implies that already in childhood, overweight and obesity are associated not only with an increase of visceral fat, but also with laboratory signs of liver damage, and the severity of these changes seems to be associated with the amount of visceral fat. Uric acid can negatively affect the development and progression of CVD by stimulating inflammatory responses (22). Hyperuricemia is closely correlated with obesity and body fat accumulation. There are several studies demonstrating a correlation between visceral fat and uric acid levels in adults (10,11). In the present study, a correlation between uric acid and EAT in children is reported for the first time. The uric acid values were higher in overweight and obese children, but this increase was not significant. So in conclusion EAT thickness in children is associated with an unfavorable cardiometabolic risk profile including biochemical signs of NAFLD and hyperuricaemia, but is not a stronger indicator than BMI.

References

1. IACOBELLIS G., PELLICELLI AM., GRISORIO B., *et al.* Relation of epicardial fat and alanine aminotransferase in subjects with increased visceral fat. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 179-183.
2. IACOBELLIS G., ASSAEL F., RIBAUDO MC., *et al.* Epicardial fat from echocardiography: a new method for visceral adipose tissue prediction. *Obes Res* 2003; 11: 304-310.
3. IACOBELLIS G., LEONETTI F. Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6300-6302.
4. IACOBELLIS G., WILLENS HJ., BARBARO G., SHARMA AM. Threshold values of high-risk echocardiographic epicardial fat thickness. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 887-892.

5. MAZUR A., OSTANSKI M., TELEGA G., MALECKA-TENDERA E. Is epicardial fat tissue a marker of metabolic syndrome in obese children? *Atherosclerosis* 2010; 211: 596–600.
6. ABACI A., TASCILAR ME., SARITA T., et al. Threshold value of subepicardial adipose tissue to detect insulin resistance in obese children. *Int J Obes* 2009; 33: 440–446.
7. FERNÁNDEZ JR., REDDEN DT., PIETROBELLI A., ALLISON DB. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr* 2004; 145: 439–444.
8. ZIMMET P., ALBERTI G., KAUFMAN F., et al. The metabolic syndrome in children and adolescents. *Lancet* 2007; 369: 2059–2061.
9. FU JF., SHI HB., LIU LR., et al. Non-alcoholic fatty liver disease: an early mediator predicting metabolic syndrome in obese children? *World J Gastroenterol* 2011; 17: 735–742.
10. HIKITA M., OHNO I., MORI Y., et al. Relationship between hyperuricemia and body fat distribution. *Intern Med* 2007; 46: 1353–1358.
11. TAMBA S., NISHIZAWA H., FUNAHASHI T., et al. Relationship between the serum uric acid level, visceral fat accumulation and serum adiponectin concentration in Japanese men. *Intern Med* 2008; 47: 1175–1180.
12. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. National cholesterol education program: report of the expert panel on blood cholesterol levels in children and adolescents. *Pediatrics* 1992; 89: 525–584.
13. GENUTH S., ALBERTI KG., BENNETT P., et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160–3167.
14. ZIMMET P., ALBERTI KG., KAUFMAN F., et al. The metabolic syndrome in children and adolescents – an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes* 2007; 8: 299–306.
15. IACOBELLIS G., LEONETTI F., DI MARIO U. Images in cardiology massive epicardial adipose tissue indicating severe visceral obesity. *Clin Cardiol* 2003; 26: 237.
16. OZDEMIR O., HIZLI S., ABACI A., et al. Echocardiographic measurement of epicardial adipose tissue in obese children. *Pediatr Cardiol* 2010; 31: 853–860.
17. LAWLOR DA., BENFIELD L., LOGUE J., et al. Association between general and central adiposity in childhood, and change in these, with cardiovascular risk factors in adolescence: prospective cohort study. *BMJ* 2010; 341: c6224.
18. BARZIN M., HOSSEINPANAH F., FEKRI S., AZIZI F. Predictive value of body mass index and waist circumference for metabolic syndrome in 6–12-year-olds. *Acta Paediatr* 2011; 100: 722–727.
19. SCHMIDT MD., DWYER T., MAGNUSSEN CG., VENN AJ. Predictive associations between alternative measures of childhood adiposity and adult cardio-metabolic health. *Int J Obes (Lond)* 2011; 35: 38–45.
20. KURTOGLU S., HATIPOGLU N., MAZICIOGLU M., et al. Insulin resistance in obese children and adolescents: HOMA-IR cut-off levels in the prepubertal and pubertal periods. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2010; 2: 100–106.
21. BURGERT TS., TAKSALI SE., DZIURA J., et al. Alanine aminotransferase levels and fatty liver in childhood obesity: associations with insulin resistance, adiponectin, and visceral fat. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4287–4294.
22. RUGGIERO C., CHERUBINI A., BLE A., et al. Uric acid and inflammatory markers. *Eur Heart J* 2006; 27: 1174–1181.

Table 1. Anthropometric, clinical and biochemical characteristics of study and control group

Variables	Overweight and obese (BMI \geq 85 percentile) (n=25)	Normal body weight (BMI < 85 percentile) (n=24)	p-value
Age (years)	13.0 \pm 2.3	12.9 \pm 3.4	0.36
Body weight (kg)	72.3 \pm 19.6	50.5 \pm 14.3	p < 0.01
Height (cm)	164.0 \pm 16.4	161.3 \pm 13.2	0.56
BMI (kg/m ²)	27.4 \pm 3.5	18.8 \pm 3.1	p < 0.01
BMI percentile	94.3 \pm 3.5	36.2 \pm 2.83	p < 0.01
BMI Z-score	-0.38 \pm 1.014	2.09 \pm 0.51	p < 0.01
Systolic BP (mmHg)	133.4 \pm 16.4	120.3 \pm 17.4	p < 0.05
Systolic BP (mmHg)	80.3 \pm 11.5	69.7 \pm 7.4	p < 0.01
Waist circumference (cm)	95.5 \pm 12.6	73.1 \pm 8.8	p < 0.01
Fasting glucose (mg/dL)	89.45 \pm 9.1	88.67 \pm 8.2	0.42
Fasting insulin (IU/l)	15.35 \pm 7.2	8.01 \pm 4.2	p < 0.05
Total cholesterol (mmol/l)	5.2 \pm 1.2	4.2 \pm 0.	p < 0.05
Triglyceride (mmol/l)	1.9 \pm 1.1	0.7 \pm 0.3	p < 0.01
HDL cholesterol (mmol/l)	1.2 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2	p < 0.05
LDL cholesterol (mmol/l)	3.1 \pm 1.2	2.4 \pm 0.7	p < 0.05
Uric acid (umol/l)	321.4 \pm 67.5	281.9 \pm 69.3	0.16
Serum Creatinine (umol/l)	67.7 \pm 8.9	72.4 \pm 7.2	0.057
Urea (mmol/l)	3.9 \pm 0.66	4.5 \pm 1.3	0.2
Total Proteins (g/l)	75.9 \pm 4.5	72.8 \pm 3.6	p < 0.05
Total Bilirubine (umol/l)	8.5 \pm 5.4	10.9 \pm 6.3	0.50
AST (U/l)	30 \pm 12	24 \pm 6	0.06
ALT (U/l)	42 \pm 30	18 \pm 6	p < 0.01
γ GT (U/l)	30 \pm 18	18 \pm 6	p < 0.05
ALP (U/l)	210 \pm 120	150 \pm 102	0.15
ApoA1 (g/l)	1.6 \pm 0.2	1.6 \pm 0.4	0.10
ApoB (g/l)	0.9 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2	p < 0.01
Hcy (umol/l)	7.8 \pm 1.8	7.5 \pm 0.6	0.08
HOMA index	3.47 \pm 1.97	1.9 \pm 1.68	P < 0.01

Data are shown as the mean \pm SD

AST – aspartate aminotransferase; *ALT* – alanine aminotransferase; γ *GT* – γ -glutamyl transferase; *ALP* – alkaline phosphatase; *ApoA1* – apoprotein A1; *ApoB* – apoprotein B; *Lp(a)* - lipoprotein lipase; *Hcy* – homocysteine; *HDL cholesterol* - high-density lipoprotein cholesterol; *LDL* - low density cholesterol; *Hcy* - Homocysteine

Table 2. Correlation of EAT and anthropometric, clinical and biochemical parameters

Variable	Mean EAT	
	r	p-value
Body weight (kg)	0.63	p<0.0001
Height (cm)	0.12	0.40
BMI – (kg/m ²)	0.80	p<0.0001
BMI percentile	0.72	p<0.0001
Waist circumference (cm)	0.68	p<0.0001
Systolic BP (mmHg)	0.40	p<0.05
Diastolic BP (mmHg)	0.43	p<0.01
Total cholesterol [mmol/l]	0.30	0.22
Triglyceride [mmol/l]	0.68	p<0.0001
HDL cholesterol (mmol/l)	-0.50	p<0.001
LDL cholesterol (mmol/l)	0.20	0.20
Fasting glucose (mg/dL)	0.26	0.10
Urea (mmol/l)	-0.29	0.08
Serum creatinine (μmol/l)	-0.27	0.09
Uric acid (μmol/l)	0.34	p<0.05
Total proteins (g/l)	0.37	p<0.05
Total bilirubine (umol/l)	-0.07	0.65
AST (U/l)	0.29	0.15
ALT (U/l)	0.37	p<0.05
γGT (U/l)	0.31	0.06
ALP (U/l)	0.23	0.17
ApoA1 (g/l)	-0.29	0.07
ApoB (g/l)	0.37	p < 0.05
Hcy (μmol/l)	-0.16	0.49
HOMA index	0.44	0.16
Fasting insulin (IU/ml)	0.27	0.31

BP – blood pressure; BMI – body mass index; Mean EAT - epicardial adipose tissue in parasternal short and long axis in systole and diastole; r – correlation coefficient; AST – aspartate aminotransferase; ALT – alanine aminotransferase; γGT – γ-glutamyl transferase; ALP – alkaline phosphatase; ApoA1 – apoprotein A1; ApoB – apoprotein B; Hcy – homocysteine

Table 3. Multiple regression analysis of some metabolic variables

Variables	Mean EAT (cm)			
	r	tc	β coefficient	p
Triglyceride [mmol/l]	0.732	2.49	0.50	p < 0.05
HDL cholesterol [mmol/l]		-1.04	-0.16	0.30
Urea acid [μmol/l]		0.79	0.11	0.43
Total proteins [g/l]		1,26	0.17	0.21
ALT [U/l]		0.44	0.06	0.66
ApoB [g/l]		-0.38	-0.06	0.70

Mean EAT - epicardial adipose tissue in parasternal short and long axis in systole and diastole; r - correlation coefficient; ALT - alanine aminotransferase; ApoB - apolipoprotein B

Table 4. Correlation of EAT, waist circumference and BMI with clinical and biochemical parameters

Variable	BMI (kg/m ²)		Mean EAT (cm)		WC (cm)	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value
Systolic BP [mmHg]	0.58	p < 0.001	0.40	p < 0.05	0.43	p < 0.05
Diastolic BP [mmHg]	0.63	p < 0.001	0.43	p < 0.01	0.65	p < 0.001
Triglyceride [mmol/l]	0.63	p < 0.001	0.68	p < 0.001	0.51	p < 0.01
HDL cholesterol mmol/l]	-0.49	p < 0.01	-0.50	p < 0.001	-0.18	0.36
Uric acid [μmol/l]	0.41	p < 0.05	0.34	p < 0.05	0.37	0.06
Total proteins [g/l]	0.36	p < 0.05	0.37	p < 0.05	0.36	0.07
ALT [U/l]	0.51	p < 0.01	0.37	p < 0.05	0.38	0.06
γGT [U/l]	0.52	p < 0.001	0.31	0.08	0.34	0.10
ApoB [g/l]	0.33	p < 0.05	0.37	p < 0.05	0.14	0.49

BP – blood pressure; BMI – body mass index; Mean EAT - epicardial adipose tissue in parasternal short and long axis in systole and diastole; r – correlation coefficient; ALT – alanine aminotransferase; γGT – γ-glutamyl transferase; ApoB – apoprotein B

INKORPORACE EPA A DHA DO PLASMATICKÝCH LIPIDŮ**B. Staňková, M. Vanta, E. Tvrzická***4. interní klinika 1. LF UK Praha*

V současné době se stále větší množství experimentálních prací zabývá možností příznivého ovlivnění kardiovaskulárních onemocnění, které jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtnosti. Jedním z rizikových faktorů těchto onemocnění jsou dyslipidemie. K jejich prevenci i léčbě patří především úprava životního stylu. Její nedílnou součástí je změna dietních návyků, kde jsou často využívány i tzv. funkční potraviny. Mezi ně patří i koncentráty esenciálních mastných kyselin. Cílem předkládané práce bylo prostudovat vliv dietní suplementace vícenenasycenými mastnými kyselinami řady n-3 (PUFA n-3) na profil mastných kyselin v triacylglycerolech, fosfolipidech a esterech cholesterolu lipoproteinů krevní plazmy. Studie proběhla u skupiny šesti osob (3 muži a 3 ženy), které byl podáván preparát MaxiCor® v dávce 1,5 g/den po dobu 35 dnů. Po extrakci lipidů z krevní plazmy byly jednotlivé lipidové třídy separovány preparativní tenkovrstevnou chromatografií a profil mastných kyselin byl stanoven kapilární plynovou chromatografií. Podávání preparátu vedlo ke zvýšení obsahu kyselin eikosapentaenové a dokosaheptaenové ve všech lipidových třídách již během prvního dne. Toto zvýšení bylo kompenzováno poklesem obsahu nasycených mastných kyselin. Snížil se i aterogenní a trombogenní index. Po vysazení preparátu se hladiny jednotlivých mastných kyselin vrátily k původním hodnotám přibližně po dvou týdnech. Charakter změn byl u všech osob obdobný, kvantitativně se změny lišily v závislosti na pohlaví a bazálních koncentracích PUFA n-3. Tento náález zřejmě souvisí s ostatními biochemickými i genetickými faktory, ale i dietními návyky.

Studie byla podporována výzkumnými projekty: PRVOUK-P25/LF1/2 Karlovy Univerzity v Praze.

VLIV FYZICKÉ AKTIVITY NA UKLÁDÁNÍ LIPIDŮ VE TKÁNÍCH: MOŽNOSTI VYUŽITÍ ¹H MR SPEKTROSKOPIE PŘI STANOVENÍ OBSAHU INTRAMYOCELULÁRNÍCH LIPIDŮ

EFFECT OF PHYSICAL ACTIVITY ON LIPID DEPOSITION IN TISSUES: THE POSSIBILITIES OF USING OF ¹H MR SPECTROSCOPY IN THE DETECTION OF INTRAMYOCYLLULAR LIPIDS

V. Škop, H. Malínská, J. Trnovská, M. Burian, M. Hüttl, L. Kazdová

Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Abstract

Lipid deposition in extraadipose tissue is one of the most serious factors associated with obesity, insulin resistance and metabolic syndrome. The positive effect of physical activity on obesity and related disorders is well documented, but the mechanism of its role in ectopic lipid deposition is unclear. In this study we analyzed the effect of spontaneous physical activity and high sucrose diet on ectopic lipid deposition and quantity of intramyocellular (IMCL) and extramyocellular (EMCL) lipids in hereditary hypertriglyceridemic (HHTg) rats. Half of the adult males in the two dietary groups had the possibility of spontaneous running in rat wheel for 4 weeks, while control animals had no possibility of extra physical activity. In both dietary groups, physical activity decreased serum concentration of nonesterified fatty acids, triglycerides and insulin, and lipid accumulation in the liver, aorta, kidney and muscle. Linear negative correlation between content of triglycerides and intensity of physical activity was found in the liver and *m. gastrocnemius*. IMCL and EMCL quantity, measured by NMR spectroscopy, decreased after physical activity. Percentage of IMCL decreased after physical activity in group fed with control diet. Our results show importance of physical activity and possibility of application of NMR spectroscopy in the quantification of IMCL and EMCL.

Úvod

Ukládání lipidů mimo tukovou tkáň, zejména v játrech a svalech (ektopické), je závažným problémem asociovaným s metabolickým syndromem a výrazně přispívá k rozvoji inzulínové rezistence těchto tkání. Mastné kyseliny produkované zejména z tukové tkáně jsou transportovány do jater a svalů, kde dochází k jejich oxidaci za zisku energie nebo k uložení ve formě triacylglycerolů (TAG). Klinické studie prokázaly, že zvýšené množství intracelulárních svalových (intramyocelulárních) lipidů (IMCL), převážně TAG, je asociováno s inzulínovou rezistencí a že jejich zvýšená akumulace přispívá k rozvoji metabolických poruch při diabetu 2. typu, obezitě nebo metabolickém syndromu (Pan et al. 1995, Jacob et al. 1999). Uložené TAG neslouží pouze jako energetická zásoba, ale také jako prekurzory lipidových signálních molekul ceramidů, diacylglycerolů (DAG) a dlouhořetězcových acyl-CoA. Ceramidy patří mezi sfingolipidy a k inzulínové rezistenci přispívají především inhibicí proteinkinázy B (Akt), která je důležitou součástí inzulínové signální kaskády (Chavez et al. 2003). Dále inhibují mitochondriální elektrontransportní systém, čímž přispívají k produkci reaktivních forem kyslíku a následně k oxidačnímu stresu (Novgorodov et al. 2011, Yu et al. 2007). DAG jsou buněčné signální molekuly, ale také meziprodukty v syntéze a odbourávání TAG. Zvýšené množství DAG je asociováno se zvýšenou aktivitou některých izoform proteinkinázy C, které inhibují inzulínovou signální dráhu (Timmers et al. 2008).

Stále však není zcela objasněn vliv fyzické aktivity na ektopické ukládání lipidů. Korelace mezi zvýšeným množstvím svalových IMCL a inzulínovou rezistencí není zcela univerzální.

U sportovců byl nalezen zvýšený obsah IMCL, přestože jejich svalová tkáň je senzitivní k působení inzulínu (Coen and Goodpaster 2012).

Neinvazivní metodou využitelnou ke stanovení množství lipidů ve svalech je ^1H spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR). Tato metoda využívá magnetických vlastností jader některých atomů – například ^1H , ^{13}C , ^{31}P , která mají nenulový magnetický moment. Taková jádra jsou pak “NMR aktivní”, tj. lze u nich pozorovat jev magnetické rezonance.

Je-li například ^1H jádro vloženo do vnějšího magnetického pole, zorientuje se magnetický moment jádra do jednoho ze dvou možných způsobů - souhlasně či nesouhlasně s vnějším magnetickým polem. Při ozáření takového jádra monochromatickým elektromagnetickým zářením o vhodné frekvenci (rezonanční frekvence) dojde k absorpci tohoto záření a ke změně orientace magnetického momentu z paralelní na antiparalelní. Nukleární magnetické momenty interagují s lokálním magnetickým polem, které se liší od vnějšího magnetického pole v důsledku stínícího efektu elektronového obalu. V závislosti na okolních strukturách tak dochází ke změně rezonanční frekvence. Změna rezonanční frekvence daného jádra ve srovnání s vhodně zvoleným standardem je označována jako chemický posun a je charakteristická pro skupiny chemicky ekvivalentních jader. Množství absorbovaného elektromagnetického záření (intenzita signálu NMR) je pak úměrné množství sledovaných jader (Volka 1995).

Na základě analýzy signálu naměřeného z vybraného objemu (volume of interest, VOI) ve tkáni lze určit koncentrace různých metabolitů, které se v dané tkáni vyskytují. Tato vlastnost činí ze spektroskopie NMR unikátní nástroj vhodný jak pro lékařský výzkum, tak i pro klinickou praxi.

Vlivem rozdílného uspořádání je touto metodou možné ve svalové tkáni sledovat dvě rozdílné lipidové struktury - extramyocelulární (EMCL) lipidy, které se nachází v tenkých vrstvách podél svalových vláken, a IMCL, tvořící drobné intracelulární sférické lipidové kapénky (Škoch et al. 2006, Machann et al. 2008).

Cílem této studie bylo sledovat vliv spontánní fyzické aktivity a vysokosacharóзовé diety na ektopické ukládání lipidů ve tkáních a další parametry metabolického syndromu, množství lipidů ve svalech analyzovat pomocí NMR spektroskopie a porovnat výsledky s enzymovým stanovením. Dále pomocí NMR sledovat vliv fyzické aktivity a vysokosacharóзовé diety na poměr množství IMCL a EMCL.

Metody

Pokusy byly provedeny u neobézních hereditárně hypertriacylglycerolemických (HHTg) potkanů, vyselektovaných z kmene Wistar jako model lidské hypertriacylglycerolemie. U tohoto kmene potkanů se vyskytují i další abnormality, zejména, inzulínová rezistence, poruchy glukóзовého metabolismu a hypertenze (Zicha 2006). V pokusech byli použiti potkaní samci ve věku 3 měsíců. Kontrolní skupina byla chována ve standardních klecích (HHTg). Pokusná zvířata byla umístěna po jednom do klecí s možností průchodu do kolového pohybového trenažéru s obvodem 106 cm. Trenažéry byly připojeny k přístroji a počítači, kde byl zaznamenáván počet otáček (Rat Activity Wheel and Cage, fa Panlab, Harvard Aparaturs, USA). Takto byla zvířata chována po dobu 4 týdnů s možností libovolně intenzivní spontánní fyzické aktivity (HHTg+SFA). Všechna zvířata byla krmena *ad libitum* standardní peletovanou dietou. Polovině zvířat v každé skupině byl k pití místo vody podáván 20% roztok sacharózy (vysokosacharóзова dieta, VSD). Celkový počet zvířat byl 8 v kontrolních skupinách obou diet, 20 ve skupině krmené kontrolní dietou a s možností fyzické aktivity a 24 ve skupině krmené vysokosacharóзовou dietou a s možností fyzické aktivity. Pro statistické porovnání kvalitativních a kvantitativních rozdílů mezi skupinami bylo ze skupin s možností fyzické aktivity vybráno 7 zvířat s podobnou intenzitou běhání (5 - 8 km/den)

Množství triacylglycerolů (TAG) v séru a po extrakci z tkání podle metody popsané v publikaci (Qi and Kazdová 2002) bylo stanoveno analytickou soupravou TG L 250 S (Erba-Lachema, ČR). Koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) byla měřena komerčním kitem free fatty acids, half micro test (Roche Diagnostic, Německo). Koncentrace sérového inzulinu byla měřena komerčním imunochemickým kitem Rat Insulin ELISA kit (Mercodia, Švédsko).

Vyšetření svalových lipidů magnetickou rezonancí bylo provedeno pomocí sekvencí PREES s parametry měření: repetiční čas TR = 2500 ms a echo časy TE = 20 a 135 ms. Během měření byla zvířata v celkové anestezii isofluranem. Stanovení probíhalo na experimentálním tomografu Bruker Biospec 47/20 (Bruker, DE), s magnetickou indukcí 4,7 T. VOI o rozměrech 5 x 2 x 13 mm byl nastaven do svalu *m. gastrocnemius* tak, aby neobsahoval mezisvalová septa. Naměřená spektra byla dále zpracována programem LC Model. Výsledky nalezeného množství IMCL CH₂ a EMCL CH₂ skupin byly vztaženy na množství kreatinu (Cr).

Výsledky a diskuze

Z potkanů s možností spontánní fyzické aktivity byly vybrány skupiny s podobnou intenzitou běhání (5 – 8 km/den). U těchto zvířat byly v séru stanoveny základní metabolické ukazatele a byly porovnány s kontrolními skupinami (bez možnosti nadstandardní fyzické aktivity) (tab. 1). Zvýšená utilizace lipidů ve svalové tkáni při fyzické aktivitě neovlivnila glykémii, ale vedla k poklesu sérových koncentrací NEMK a TAG v lačném i postprandiálním stavu. Změny v metabolismu lipidů se dále projevíly ve sníženém množství ektopicky uložených TAG v játrech, kosterním svalu (*m. gastrocnemius*), bránici, aortě a ledvinách (tab. 2). Zvýšenou citlivost těchto tkání (zejména jaterní a svalové) k účinkům inzulinu vlivem nižšího množství intracelulárních lipidů naznačuje nález výrazně nižší koncentrace sérového inzulinu u fyzicky aktivních zvířat (tab. 1).

Části potkanů byla podávána vysokosacharózová dieta, která zvyšuje syntézu lipidů v játrech a potencuje metabolické abnormality HHTg potkanů. Tato zvířata vykazovala v porovnání s potkany, kterým byla podávána standardní dieta, výrazně zvýšené sérové koncentrace TAG na lačno i postprandiálně a mírně zvýšené množství NEMK a inzulinu (tab. 1). Dále bylo zvýšeno množství TAG ektopicky uložených ve tkáních. Fyzická aktivita v rozsahu 5 – 8 km/den výrazně zmírnila negativní účinky vysokosacharózové diety (tab. 1, 2). Všechny sledované parametry, kromě obsahu TAG v srdci a glykemie, byly vlivem fyzické aktivity pozitivně ovlivněny. Některé hodnoty se blížily k hodnotám skupiny s pohybovou aktivitou na standardní dietě, což podporuje dříve publikovanou hypotézu, že pohybová aktivita může mít při terapii metabolického syndromu a souvisejících poruch větší efekt než pouhá kalorická restrikce (Trachta 2012).

Tabulka 1. Vliv spontánní fyzické aktivity a vysokosacharóзовé diety na sérové parametry u HHTg potkanů.

	HHTg	HHTg + SFA	P	HHTG+VSD	HHTG + VSD + SFA	P
glykémie na lačno (mmol/l)	5,33 ± 0,41	4,85 ± 0,49	NS	4,92 ± 0,53	5,28 ± 0,33	NS
glykémie postprandiální (mmol/l)	8,55 ± 0,39	8,68 ± 0,32	NS	8,6 ± 0,5	8,04 ± 0,43	NS
TAG na lačno (mmol/l)	5,54 ± 0,45	2,18 ± 0,36	0,05	8,57 ± 0,54	4,41 ± 0,46	0,05
TAG postprandiální (mmol/l)	8 ± 0,43	4,04 ± 0,26	0,05	14,33 ± 0,96	10,2 ± 0,44	0,05
NEMK (mmol/l)	1,4 ± 0,16	0,86 ± 0,06	0,05	1,75 ± 0,25	1,01 ± 0,08	0,05
Inzulín (nmol/l)	0,4 ± 0,044	0,26 ± 0,018	0,05	0,53 ± 0,06	0,34 ± 0,032	0,05

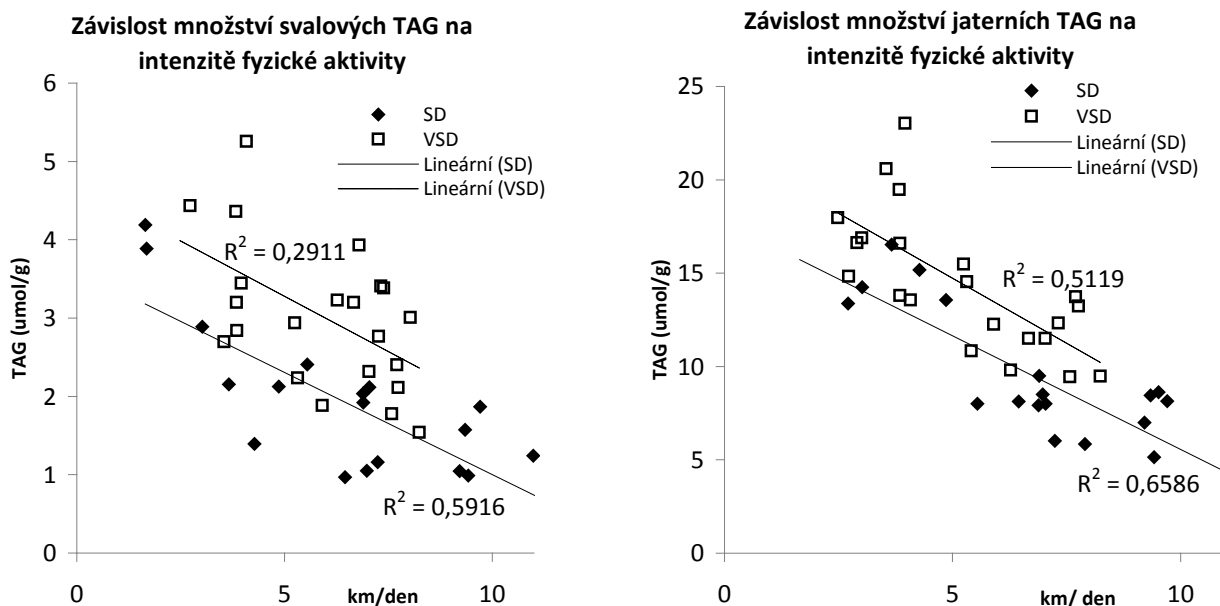
Hodnoty udávají průměr ± SE; P: statistická významnost rozdílu mezi skupinami.

Tabulka 2. Vliv spontánní fyzické aktivity a vysokosacharóзовé diety na ektopické ukládání TAG u HHTg potkanů.

tkáň	obsah TAG (μmol/g)		P	obsah TAG (μmol/g)		P
	HHTg	HHTg + SFA		HHTG+VSD	HHTG + VSD + SFA	
játra	14,6 ± 1,4	9,8 ± 1,1	0,05	19,3 ± 1,7	13,05 ± 1,1	0,05
<i>m. gastrocnemius</i>	4,7 ± 0,58	2,44 ± 0,26	0,05	5,76 ± 0,67	3,01 ± 0,29	0,05
srdce	2,1 ± 0,25	1,95 ± 0,23	NS	2,75 ± 0,3	2,36 ± 0,26	NS
bránice	35,1 ± 2,7	24,3 ± 0,5	0,05	39,4 ± 5,2	27,9 ± 2,8	NS
aorta	58,5 ± 4,7	35,5 ± 8,1	0,05	89,7 ± 7,5	33,4 ± 4,6	0,05
ledvina	6,17 ± 0,54	4,14 ± 0,43	0,05	7,54 ± 1,1	3,66 ± 0,51	0,05

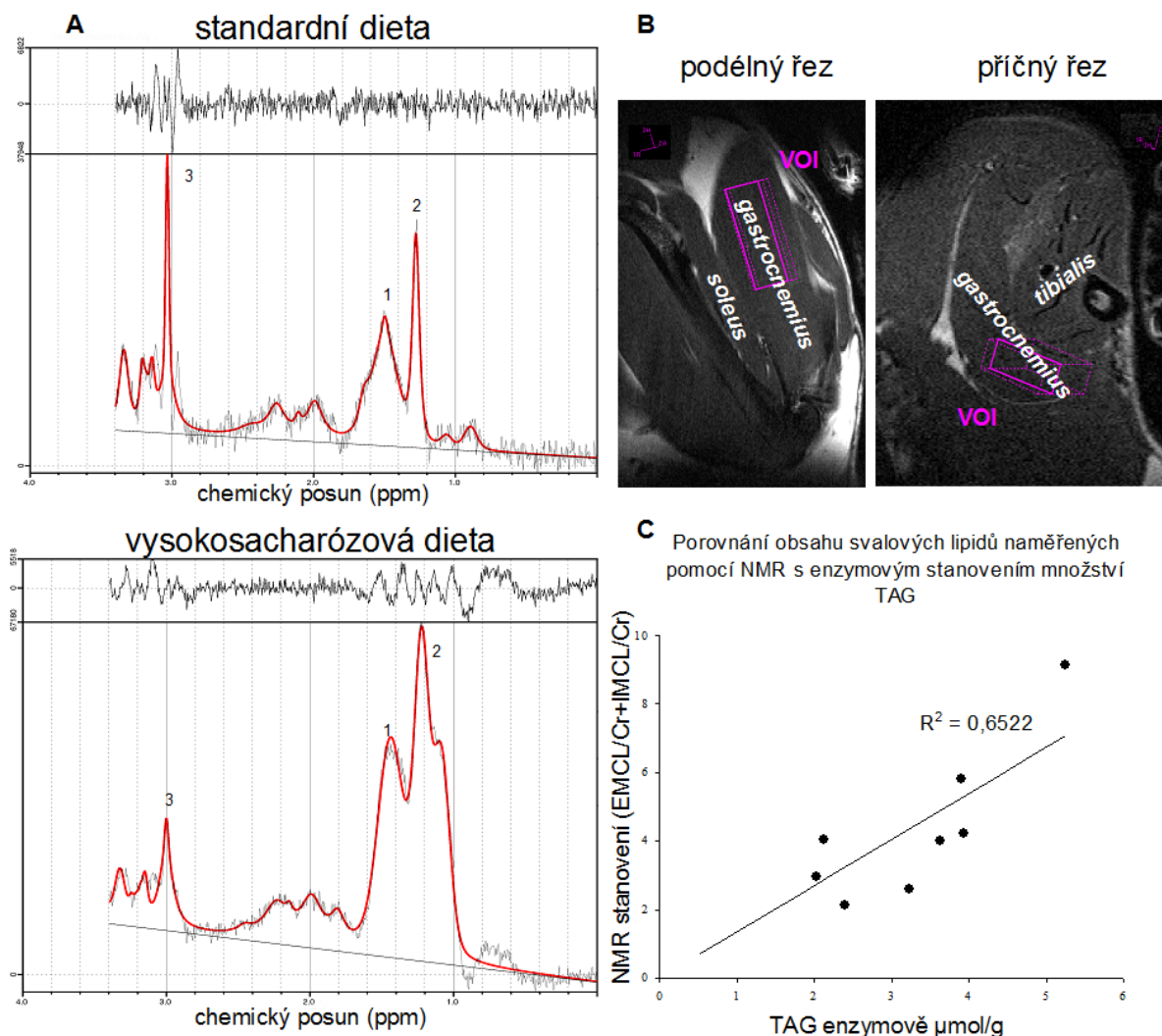
Hodnoty udávají průměr ± SE; P: statistická významnost rozdílu mezi skupinami.

Sledování korelace mezi množstvím TAG uložených v játrech a svalech a intenzitou pohybové aktivity ukázalo lineárně klesající závislost mezi koncentrací TAG ve sledovaných tkáních a průměrnou vzdáleností, kterou zvířata za den uběhla (obr. 1). Tato korelace byla nalezena u obou typů diet.



Obrázek 1. Korelace mezi množstvím svalových a jaterních lipidů a průměrnou intenzitou fyzické aktivity u HHTg potkanů.

Množství IMCL a EMCL bylo měřeno pomocí NMR spektroskopie. Potkani s možností spontánní fyzické aktivity byli vybráni tak, aby jejich intenzita běhání byla 5 - 8 km/den. Na obr. 2A jsou ukázky charakteristických spekter získaných analýzou svalu *m. gastrocnemius* potkana ze skupiny krmené kontrolní nebo vysokosacharózovou dietou. Je zde patrné výrazné zvýšení celkového obsahu EMCL-CH₂ i IMCL-CH₂ skupiny ve srovnání s kreatinem vlivem vysokosacharózové diety. Při tomto stanovení hraje významnou roli umístění oblasti VOI tak, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků vlivem přítomnosti mezisvalových sept, umístění VOI do více než jednoho svalu (různě orientovaná svalová vlákna zkreslují výsledky u EMCL), nebo dokonce umístění části VOI do oblasti podkožního tuku případně jiného tukového ložiska (Škoch et al. 2006, Machann et al. 2008). Z tohoto důvodu, a vzhledem k velikosti potkaních svalů, je stanovení lipidů ve svalech pomocí NMR u potkanů ve srovnání s lidmi výrazně obtížnější. Umístění VOI v této studii je ukázáno na obr. 2B. Po naměření NMR spektra bylo v daných svalech stanoveno celkové množství TAG enzymově pomocí analytické soupravy. Porovnání výsledků zjištěných pomocí obou metod (obr. 3C) ukazuje dobrou korelaci, ale velkou chybu měření, která někdy dosahuje až 60 %. Tato chyba je pravděpodobně způsobena EMCL, jejichž chyba měření se podle literatury uvádí až 50 %, zatímco chyba u IMCL je obvykle menší než 10 % (Škoch et al. 2006, Machann et al. 2008). Dalším vysvětlením rozdílů při různých metodách stanovení jsou sledované látky. Zatímco enzymově je stanoven pouze obsah TAG, pomocí NMR je stanovena CH₂ skupina, která může pocházet i z jiných lipidových tříd, přestože TAG jsou nejvíce zastoupenou lipidovou třídou. V některých případech může záležet také na délce a nasycenosti mastných kyselin, která je fyzickou aktivitou a vysokosacharózovou dietou u HHTg potkanů výrazně ovlivněna (Škop et al. 2012). Proto se pro NMR stanovení jako lepší parametr než CH₂ skupina v literatuře udává skupina CH₃, kterou má každá mastná kyselina jen jednou (Škoch et al. 2006).



Obrázek 2 Stanovení svalových lipidů pomocí NMR. A: Typická spektra získaná při stanovení intramyocelulárních lipidů u kontrolních potkanů a u potkanů krměných vysokosacharózovou dietou. 1: EMCL-CH₂; 2: IMCL-CH₂; 3: kreatin B: Umístění oblasti VOI v lýtkové části nohy při NMR stanovení. C: Korelace mezi výsledky obsahu svalových lipidů získanými pomocí NMR a obsahem TAG ve stejných svalech stanovených enzymovou analytickou soupravou.

Stanovení EMCL a IMCL pomocí NMR je uvedeno v tab. 3. U potkanů krměných kontrolní dietou spontánní fyzická aktivita snížila množství IMCL a vedla nižšímu procentuálnímu zastoupení IMCL. Naproti tomu u potkanů, kterým byla podávána dieta s vysokým podílem sacharózy, fyzická aktivita vedla k výraznějšímu poklesu množství EMCL, ke stejnému snížení IMCL, ale procentuální zastoupení IMCL nebylo ovlivněno.

Klesající závislost mezi množstvím svalových TAG spolu se snižujícím se zastoupením IMCL je však v mírném rozporu s výsledky nalezenými u atletů, u kterých dochází vlivem fyzické aktivity ke zvýšení množství IMCL jako zdroje svalové energie (Goodpaster et al. 2001). Nejpravděpodobnějším vysvětlením je stále nedostatečná intenzita fyzické aktivity. Pokud u HHTg potkanů existuje hranice, kdy množství svalových lipidů začne vlivem fyzické aktivity stoupat, je intenzita této fyzické aktivity větší než 11 km/den. Pokud se pokusíme tento výsledek aproximovat na lidské parametry, znamená to, že jen u vrcholových sportovců bude docházet ke zvýšení IMCL vlivem fyzické aktivity. Běžná fyzická aktivita většiny populace bude množství IMCL snižovat a pro tuto část populace tak bude stanovení IMCL

vhodným klinicky využitelným ukazatelem inzulínové rezistence svalové tkáně a dalších parametrů metabolického syndromu.

Tabulka 3. Vliv spontánní fyzické aktivity a vysokosacharóзовé diety na obsah IMCL a EMCL ve svalu *m. gastrocnemius* stanovený pomocí NMR spektroskopie.

Parametr	HHTg	HHTg + SFA	Vliv SFA (%)	HHTG+VSD	HHTG + VSD + SFA	Vliv SFA (%)
EMCL-CH ₂ /Cr	2,8 ± 0,4	2,06 ± 0,12	-27	5,88 ± 2,2	2,98 ± 1,3	-50
IMCL-CH ₂ /Cr	2,11 ± 0,5	0,96 ± 0,5	-55	5,52 ± 1,6	2,34 ± 0,94	-58
% IMCL	43 ± 2	28 ± 11	-37	48 ± 9	48 ± 14	0

Hodnoty udávají průměr ± SE; EMCL-CH₂/Cr : Plocha píku CH₂ skupiny pocházející z extramyocelulárních lipidů vztažená na plochu píku kreatinu; IMCL-CH₂/Cr : Plocha píku CH₂ skupiny pocházející z intramyocelulárních lipidů vztažená na plochu píku kreatinu; % IMCL procentuální zastoupení IMCL v celkovém množství lipidů.

Závěr

Spontánní fyzická aktivita má i v nepřítomnosti obezity pozitivní účinky na organismus, zejména ve vztahu k lipidovému metabolismu a ektopickému ukládání triacylglycerolů. Výrazně zmírňuje negativní účinky konzumace sacharózy a vede v řadě případů téměř k normalizaci metabolických abnormalit. Stanovení intramyocelulárních lipidů s využitím spektroskopie NMR je neinvazivní metoda vhodná pro klinické využití při studiu inzulínové rezistence svalové tkáně a asociovaných poruch.

Studie byla podpořena grantem GAČR P301/11/2418

Literatura

- CHAVEZ JA., KNOTTS TA., WANG LP., et al. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 2003; 278: 10297-10303.
- COEN PM., GOODPASTER BH. Role of intramyocellular lipids in human health. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 391-398.
- GOODPASTER BH., HE J., WATKINS S., KELLEY DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5755-5761.
- JACOB S., MACHANN J., RETT K., et al. Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 1999; 48: 1113-1119.
- MACHANN J., STEFAN N., SCHICK F., et al. (1)H MR spectroscopy of skeletal muscle, liver and bone marrow. *Eur J Radiol* 2008; 67: 275-284.
- NOVGORODOV SA., WU BX., GUDZ TI., et al. Novel pathway of ceramide production in mitochondria: thioesterase and neutral ceramidase produce ceramide from sphingosine and acyl-CoA. *J Biol Chem* 2011; 286: 25352-25362.
- PAN DA., LILLIOJA S., MILNER MR., et al. Skeletal muscle membrane lipid composition is related to adiposity and insulin action. *J Clin Invest* 1995; 96: 2802-2808.
- QI N., KAZDOVA L., ZIDEK V., et al. Pharmacogenetic evidence that cd36 is a key determinant of the metabolic effects of pioglitazone. *J Biol Chem* 2002; 277: 48807-48807.
- ŠKOCH A., JÍRŮ F., DEZORTOVÁ M., et al. Intramyocellular lipid quantification from 1H long echo time spectra at 1.5 and 3 T by means of the LCModel technique. *J Magn Reson Imaging* 2006; 23: 728-735.

ŠKOP V., MALÍNSKÁ H., BURIAN M., KAZDOVÁ L. Vztah fyzického pohybu k aktivitě hnědé tukové tkáně a parametrům metabolického syndromu. *Atherosklerosa* 2012. Praha 2012, 27-32.

TIMMERS S., SCHRAUWEN P., DE VOGEL J. Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiol Behav* 2008; 94: 242-251.

TRACHTA P., HALUZÍK M. Physical activity and subclinical inflammation: mechanisms of action and clinical implications. *DMEV* 2012; 15: 83-92.

VOLKA K. Analytická chemie I. Praha, VŠCHT 1995.

YU J., NOVGORODOV SA., CHUDAKOVA D., et al. JNK3 signaling pathway activates ceramide synthase leading to mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 2007; 282: 25940-25949.

ÚLOHA TRANSLOKÁZY MASTNÝCH KYSELIN (FAT/CD36) V PORUCHÁCH LIPIDOVÉHO METABOLISMU

ROLE OF FATTY ACID TRANSLOCASE (FAT/CD36) IN LIPID METABOLISM DISORDERS

J. Trnovská¹, H. Seidlová¹, H. Malínská¹, O. Oliyarnyk,¹ L. Kazdová¹, M. Pravenec²

¹Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

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

Abstract

Cd36 fatty acid translocase (FAT/Cd36) is a multifunctional membrane glycoprotein that facilitates the cellular uptake of long-chain fatty acids and uptake of oxidized lipoproteins. In this study we analyzed in SHR rats that harbour deletion mutation of Cd36 gene and in transgenic SHR expressing functional form wild type Cd36. Results indicate that rescue of defective Cd36 under the control of a universal promoter decreased serum levels of triacylglycerols (TAG) and non-esterified fatty acids, improved glucose tolerance and insulin sensitivity to insulin action a positively influenced fatty acid spectrum in membrane phospholipids. FAT/Cd36 transgenic expression exclusively in muscle tissue was associated with increased palmitate oxidation in skeletal muscles, decreased intramuscular TAG levels, and with increased TAG clearance at the expense of a decrease in both basal and insulin-stimulated glycogenesis in skeletal muscles, increased serum glucose and insulin levels and impaired glucose tolerance when compared to SHR nontransgenic controls. Results indicate that a functional FAT/Cd36 must be expressed universally for amelioration of disorders in lipid and sacharide metabolism associated with a deletion mutation in the FAT/Cd36.

Úvod

Transport a utilizace mastných kyselin ve tkáních je předmětem intenzivního výzkumu pro důležitou úlohu v rozvoji inzulínové rezistence, obezity, diabetu 2. typu a kardiovaskulárních poruch. Transport mastných kyselin do tkání zajišťuje nejen dostatek energetického substrátu, ale může mít i negativní důsledky projevující se lipotoxickými účinky: akumulací triacylglycerolů (TAG) a jejich cytotoxických derivátů (diacylglycerolů, ceramidů), sníženou utilizací glukózy, mitochondriální dysfunkcí a apoptózou (Carley and Severson 2005). V klinických studiích byly zvýšené koncentrace TAG zjištěny nejen u pacientů s diabetem 2. typu, obezitou, metabolickým syndromem ale i se srdeční dysfunkcí (Szczepaniak et al. 2003) a u 30 % pacientů se srdečním selháním (Sharma et al. 2004). Transport mastných kyselin do buněk se děje dvěma mechanizmy – v malé míře difúzí z 80 % transportními proteiny a závisí tak nejen na koncentraci extracelulárních mastných kyselin, ale i na aktivitě membránových a intracelulárních přenašečů.

Klíčovou úlohu v metabolismu mastných kyselin má transmembránový přenos mastných kyselin přes sarkolemu, který je zprostředkován translokázou mastných kyselin, kódovanou genem Cd36 (FAT/Cd36). Přenos mastných kyselin mezi intracelulárními kompartmenty zajišťují cytoplazmatické vazebné proteiny (FABP) lokalizované v plazmatických membránách a mikrozomech (Chabowski et al. 2004). FAT/Cd36 je membránový multiligandový receptor s vysokou afinitou pro mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a oxidované lipoproteiny. Nejvíce exprimovaný je ve tkáních s aktivním metabolismem mastných kyselin – v myokardu, svalech a v tukové tkáni. FAT/Cd36 mRNA v těchto tkáních je ovlivněna podílem tuku v dietě, diabetem, inzulínem, tělesnou aktivitou a agonisty PPAR.

U pacientů byla vysoká exprese Cd36 pozorována v makrofázích a pěnových buňkách v aterosklerotických lézích v aortě a koronárních tepnách (Nakagawa-Toyama et al. 2001).

V roce 1999 Aitman a spol. identifikovali u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) delecí v genu Cd36, který kóduje translokázu mastných kyselin na chromozomu 4 (Aitman et al. 1999). Obnovení funkčního genu pro Cd36 přenosem části chromozomu 4 od BN potkanů vedlo u kongenní linie k expresi Cd36 ve tkáních a normalizovalo hladiny sérových lipidů. Snížilo obsah TAG v myokardu a zvýšilo senzitivitu tukové a svalové tkáně k účinku inzulínu (Pravenec et al. 2001).

V klinických studiích byla deficece Cd36 zjištěna u 3-10 % Japonců, Thajců a Afričanů (Yanai et al. 2000). V populaci Američanů evropského původu tvoří tyto lidé méně než 0,3 % (Curtis et al. 1999). Osoby s deficitem Cd36 mají snížené vychytávání mastných kyselin v srdci, která byla zjištěna u 40 % japonských pacientů s dědičnou hypertrofickou kardiomyopatií (Tanaka et al. 1997). Ze sedmi pacientů, u kterých byl prokázán deficit Cd36, byl u třech diagnostikován diabetes 2. typu spojený u jednoho pacienta s inzulínovou rezistencí a u jednoho s hypertriglyceridémií. Zbývající pacienti měli hypertenzi (Hwang et al. 1998). Podle Yuasa-Kawase et al. (2012) jsou pacienti s deficiencí Cd36 třikrát častěji postiženi koronární arteriální chorobou než lidé v běžné populaci.

Všechny tyto poznatky naznačují, že nedostatek Cd36, jak u lidí tak potkanů, může mít důležitou úlohu v patogenezi dyslipidémie, inzulínové rezistence, hypertenze a kardio-vaskulárních chorob.

Cílem studie bylo zjistit, zda spontánní delece translokázy mastných kyselin a obnova funkčního genu pro FAT/Cd36 tkáních u SHR potkanů ovlivní zastoupení mastných kyselin v membránových fosfolipidech a zda obnova funkčního genu pro FAT/Cd36 specificky ve svalové tkáni ovlivní dyslipidémii a inzulínovou rezistenci u SHR potkanů.

Pokusy jsme prováděli u dospělých samců spontánně hypertenzních potkanů (SHR), kteří mají přirozenou delecí genu kódujícího transportér mastných kyselin FAT/Cd36. Dále byli v pokusech použiti transgenní potkani exprimující funkční formu Cd36. Obnovení funkčního genu pro Cd36 ve tkáních bylo provedeno injikováním progenitorových SHR zygot s cDNA konstruktem obsahujícím funkční Cd36 pod kontrolou univerzálního promotoru EF-1 α , která vede k univerzální expresi Cd36 ve tkáních. Dále byli v pokusech použiti transgenní potkani exprimující funkční formu Cd36 specificky ve svalové tkáni, kteří byli získáni mikroinjikováním zygot s cDNA konstruktem obsahujícím funkční Cd36 a gen myší kreatin kinázy (SHR-MCKCd36). Transgenní potkani byli geneticky identičtí s potkany SHR s výjimkou exprese FAT/Cd36 ve tkáních. V pokusech byla zvířatům 2 týdny před ukončením pokusu podávána dieta obsahující 60 % fruktózy. Spektrum mastných kyselin v membránových fosfolipidech bylo sledováno plynovou chromatografií po separaci lipidových tříd tenkovrstevnou chromatografií a po převedení mastných kyselin do formy metylesterů, které byly eluovány hexanem a analyzovány na plynovém chromatografu. Rezistence tkání k inzulínu byla monitorována in vitro v bráničním svalu při inkubaci tkáně bez inzulínu a s inzulínem (250 μ U/ml) podle inkorporace ¹⁴C-U-glukózy do glykogenu.

Orální glukózový toleranční test byl proveden po intragastrickém podání glukózy (3g/100g t. hm.) po nočním lačnění. Lipidový toleranční test byl proveden metodou dle Colomba (Colombo et al. 2003). Koncentrace triglyceridů, NEMK, glukózy v séru a obsah triglyceridů ve svalu byly stanoveny pomocí komerčně dostupných enzymatických testů.

Výsledky

U transgenních potkanů byla exprese Cd36 pod kontrolou univerzálního promotoru EF-1 α spojena s nižšími hladinami sérových triglyceridů, neesterifikovaných mastných kyselin a inzulínu. Rovněž glukózová tolerance hodnocená jako plocha pod glykemickou křivkou při OGGT byla u transgenních zvířat zlepšena (tabulka 1).

Tabulka 1. Vliv transgenní exprese Cd36 na sérové koncentrace lipidů, parametry glukózové tolerance a obsah TAG v myokardu

	SHR	SHR-Cd36	P <
S - TAG, mmol/l	1,22 ± 0,09	0,81 ± 0,07	0,05
S - NEMK, mmol/l	0,462 ± 0,023	0,374 ± 0,027	0,05
S - glukóza, mmol/l	4,14 ± 0,10	4,22 ± 0,11	N.S.
S - insulin, nmol/l	1,27 ± 0,11	0,91 ± 0,08	0,05
AUC _{0-120min.} při OGTT, mmol/l	816 ± 12	787 ± 13	0,05
TAG v myokardu, μmol/g	2,85 ± 0,25	1,92 ± 0,23	0,05

Hodnoty udávají průměr ± SEM, počet zvířat ve skupině 7-8.

Analýza zastoupení mastných kyselin ve fosfolipidech v séru a v kosterním svalu je uvedena v tabulce 2. Transgenní exprese Cd36 zvýšila zastoupení mononenasycené mastné kyseliny olejové (C18:1n9) a polynenasycených kyselin řady n-6 a řady n-3. Ve fosfolipidech kosterního svalu byla spojena s podobnými, i když méně výraznými změnami v zastoupení mastných kyselin a snížila podíl kyseliny dihomogama linolenové (C20:3n6) jak v sérových tak i tkáňových fosfolipidech.

Výsledky uvedené v Tab. 3 ukazují, že specificky cílená exprese FAT/Cd36 pouze ve svalové tkáni snížila sérové koncentrace NEMK, zatímco hladiny sérových triglyceridů byly u transgenních potkanů zvýšeny. SHR potkani s transgenní expresí FAT/Cd36 měli zvýšené hladiny lačné i pozátěžové glykémie při OGTT.

V kosterním svalu (m. soleus) transgenní exprese snížila koncentraci triglyceridů, pravděpodobně v důsledku zvýšené oxidace mastných kyselin a nikoliv jejich reesterifikace. Pro tento předpoklad svědčí zvýšená inkorporace ¹⁴C - palmitátu do CO₂ při inkubaci viscerální tukové tkáně in vitro.

Tabulka 2. Profil mastných kyselin ve fosfolipidech séra a kosterního svalu

Mastné kyseliny	SHR	SHR-Cd36	p	SHR	SHR-Cd36	p
	sérum			m. soleus		
14:0	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,03	N.S.	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02	N.S.
16:0	17,97 ± 0,97	16,68 ± 1,04	N.S.	10,64 ± 1,71	11,72 ± 1,11	N.S.
18:0	17,76 ± 0,33	16,78 ± 0,91	N.S.	21,79 ± 0,39	20,93 ± 0,37	N.S.
20:0	8,90 ± 0,99	10,29 ± 1,64	N.S.	2,46 ± 0,32	0,95 ± 0,39	< 0,05
Σ SFA	44,73 ± 0,78	43,86 ± 1,94	N.S.	34,95 ± 1,35	33,64 ± 1,12	N.S.
16:1n7	0,18 ± 0,02	0,26 ± 0,05	N.S.	0,19 ± 0,05	0,29 ± 0,04	N.S.
18:1n9	3,48 ± 0,12	4,35 ± 0,36	< 0,05	4,30 ± 0,14	4,45 ± 0,13	N.S.
18:1n7	2,29 ± 0,07	2,09 ± 0,13	N.S.	3,88 ± 0,009	3,69 ± 0,12	N.S.
20:1n9	0,75 ± 0,11	0,75 ± 1,02	N.S.	0,52 ± 0,10	0,78 ± 0,19	N.S.
Σ MUFA	6,69 ± 0,10	7,45 ± 0,51	N.S.	8,89 ± 0,24	9,22 ± 0,27	N.S.
18:2n6	14,96 ± 0,41	15,22 ± 0,59	N.S.	18,46 ± 0,72	20,49 ± 0,64	N.S.
18:3n6	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	N.S.	0,15 ± 0,02	0,10 ± 0,01	< 0,05
20:2n6	0,19 ± 0,04	0,44 ± 0,06	< 0,05	0,40 ± 0,06	1,16 ± 0,09	< 0,05
20:3n6	0,30 ± 0,01	0,24 ± 0,02	< 0,05	0,25 ± 0,02	0,17 ± 0,02	< 0,05
20:4n6	25,38 ± 0,56	22,71 ± 2,21	N.S.	27,60 ± 1,74	25,08 ± 0,84	N.S.
22:4n6	0,58 ± 0,04	1,49 ± 0,19	< 0,05	2,04 ± 0,11	2,68 ± 0,10	< 0,05
Σn-6 PUFA	41,51 ± 0,94	40,19 ± 2,14	N.S.	48,91 ± 1,51	49,69 ± 1,00	N.S.
18:3n3	4,79 ± 0,57	5,55 ± 1,02	N.S.	0,60 ± 0,15	0,62 ± 0,14	N.S.
20:5n3	0,36 ± 0,04	0,55 ± 0,07	< 0,05	0,59 ± 0,13	0,57 ± 0,13	N.S.
22:5n3	0,68 ± 0,12	1,01 ± 0,15	< 0,05	1,08 ± 0,19	1,05 ± 0,24	N.S.
22:6n3	1,23 ± 0,07	1,40 ± 0,13	N.S.	4,97 ± 0,57	5,22 ± 0,31	N.S.
Σn-3 PUFA	7,07 ± 0,72	8,50 ± 1,22	N.S.	7,24 ± 0,85	7,46 ± 0,60	N.S.
ΣSFA/Σ UFA	0,81 ± 0,03	0,80 ± 0,71	N.S.	0,54 ± 0,03	0,51 ± 0,02	N.S.

Hodnoty udávají průměr mol% mastných kyselin ± SEM, počet zvířat ve skupině 9-10.

Tabulka 3. Vliv transgenní exprese Cd36 ve svalové tkáni na sérové a tkáňové koncentrace lipidů a parametry glukózové tolerance

	SHR	SHR-MCK Cd36	P <
S - triglyceridy, mmol/l	1,52 ± 0,12	2,25 ± 0,12	0,05
S - NEMK, mmol/l	0,574 ± 0,027	0,464 ± 0,033	0,05
S - glukóza, mmol/l	4,22 ± 0,11	5,14 ± 0,10	0,001
S - insulin, nmol/l	0,91 ± 0,08	1,27 ± 0,11	0,05
AUC 0-120min. při OGTT, mmol/l	757 ± 15	816 ± 12	0,01
TAG v m. soleus, μmol/g	4,81 ± 0,32	3,80 ± 0,17	0,05
Oxidace palmitátu, nmol/l/2hod.	385 ± 34	660 ± 92	0,05

Hodnoty udávají průměr ± SEM, počet zvířat ve skupině 7-8.

Diskuze

U transgenních potkanů byla exprese Cd36 pod univerzálním promotorem spojena s nižšími hladinami sérových triglyceridů, neesterifikovaných mastných kyselin a inzulínu. Rovněž glukózová tolerance hodnocená jako plocha pod glykemickou křivkou při OGTT byla u transgenních zvířat zlepšena. Uvedené výsledky ukazují, že translokáza mastných kyselin FAT/Cd36 může ovlivňovat složení membránových fosfolipidů, které jsou vedle proteinů a cholesterolu hlavní strukturální složkou membrán. Vyšší zastoupení poly-nenasycených mastných kyselin spojené se zvýšenou aktivitou $\Delta 5$ desaturázy (153 ± 18 vs 110 ± 14 ; $p < 0,05$) zjištěné u zvířat s funkční FAT/Cd36 může být jedním z mechanismů, který se podílí na zlepšení poruch asociovaných s inzulínovou rezistencí. Bylo prokázáno, že aktivita tohoto enzymu má vztah k inzulínové senzitivitě. Nižší aktivita $\Delta 5$ desaturázy byla zjištěna v sérových fosfolipidech u diabetických a obézních pacientů s inzulínovou rezistencí (Vesby 2002).

Transgenní exprese Cd36 pouze ve svalové tkáni zvýšila kapacitu svalu pro vychytávání a oxidaci mastných kyselin. S tím souladu jsou i snížené koncentrace sérových NEMK a TAG v kosterním svalu transgenních potkanů a nižší koncentrace cirkulujících triglyceridů při lipidovém tolerančním testu. Překvapivým nálezem jsou zvýšené koncentrace sérových triglyceridů u transgenních potkanů, které pravděpodobně souvisí se zvýšenou syntézou triglyceridů v játrech při vysokém podílu fruktózy v dietě.

U transgenních zvířat s expresí Cd36 ve svalech byla zvýšena glykémie, hyperinzulínémie, zhoršena glukózová tolerance a snížena syntéza glykogenu ve svalu jak v bazálním stavu, tak i po stimulaci inzulínem. Tyto nálezy jsou v souladu s hypotézou podle které ve svalové tkáni oxidace mastných kyselin kompetuje s využitím glukózy pro oxidaci (Randle 1998). Rovněž podporují hypotézu o tom, že zvýšený transport mastných kyselin do svalů inhibuje inzulínem stimulované neoxidativní využití glukózy pro syntézu glykogenu. Porovnání těchto účinků ukazuje, že svalově specifická exprese Cd36 nepostačuje ke zlepšení metabolických poruch spojených s delecí FAT/Cd36 u SHR potkanů. Pro příznivé ovlivnění lipidového metabolismu, inzulínové rezistence a glukózové tolerance musí být funkční FAT/Cd36 i v dalších tkáních, v nichž jsou mastné kyseliny a glukóza využívány.

Studie byla podpořena grantem GAČR P301/11/2418 a MZ ČR – RVO („Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM IČ 00023001“).

Literatura

- AITMAN TJ., GLAZIER AM., WALLACE CA., et al. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nature Genet* 1999; 21: 76-83.
- CARLEY AN., SEVERSON DL. Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1734: 112-126.
- CURTIS BR., ASTER RH. Incidence of the Nak(a)-negative platelet phenotype in African Americans is similar to that of Asians. *Transfusion* 1996; 36:331-334.
- CHABOWSKI A., COORT SL., CALLES-ESCANDON J., et al. Insulin stimulates fatty acid transport by regulating expression of FAT/CD36 but not FABPpm. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E781-789.
- HWANG EH., TAKI J., YASUE S., et al. Absent myocardial iodine-123-BMIPP uptake and platelet/monocyte CD36 deficiency. *J. Nucl Med* 1998; 39: 1681-1684.
- NAKAGAWA-TOYAMA Y., YAMASHITA S., MIYAGAWA J., et al. Localization of CD36 and scavenger receptor class A in human coronary arteries--a possible difference in the contribution of both receptors to plaque formation. *Atherosclerosis* 2001; 156: 297-305.
- PRAVENEK M., LANDA V., ZIDEK V., et al. Transgenic rescue of defective Cd36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat Genet* 2001; 27:156-158.
- RANDLE PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabet Metab Rev* 1998; 14: 263-283.
- SHARMA S., ADROGUE JV., GOLFMAN L., et al. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* 2004; 18:1692-1700.
- SZCZEPANIAK LS., DOBBINS RL., METZGER GJ., et al. Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging. *Magn Reson Med* 2003; 49: 417-423.
- TANAKA T., SOHMIYA K., KAWAMURA K. Is CD36 deficiency an etiology of hereditary hypertrophic cardiomyopathy? *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 121-127.
- VESBY B., GUSTAFSSON IB., TENGBLAD S., et al. Desaturation and elongation of Fatty acids and insulin action. *Ann NY Acad Sci* 2002; 967: 183-195.
- YANAI H., CHIBA H., MORIMOTO M., et al. Type I CD36 deficiency in humans is not associated with insulin resistance syndrome. *Thromb Haemost* 2000; 83:786.
- YUASA-KAWASE M., MASUDA D., YAMASHITA T., et al. Patients with CD36 deficiency are associated with enhanced atherosclerotic cardiovascular diseases. *J Atheroscler Thromb* 2012; 19: 263-275.

ALELY APOE A JEJICH KLINICKÝ VÝZNAM**APOE ALLELES AND THEIR CLINICAL IMPORTANCE**

Z. Vlčková, M. Bittóová, M. Koudová, R. Alánová, V. Indráková, M. Hrabíková, E. Lavická, M. Hlaváčová, K. Perglerová, M. Rímská, I. Slepíčková, V. Nedvědová, L. Pavlíčková

GHC Genetics s.r.o. – NZZ, Praha

Abstract

APOE gene is polymorphic and has three alleles - APOE-E2, APOE-E3 and APOE-E4, encoding apolipoprotein E (ApoE) - the main lipoprotein chylomicrons and VLDLs. E4 allele is associated with higher development of atherosclerosis, Alzheimer's disease and impaired cognitive function, allele E2 to lower cholesterol levels, reduced risk of atherosclerosis and a reduced risk of developing Alzheimer's disease, E3 is normal functional allele. The study examined 800 female 800 male Czech population (18 - 69 years). DNA was isolated from buccal swabs kit Flocked Swabs or venous blood using a kit QIAmp DNA Minikit and apparatus for semi-automatic DNA isolation QuickGene 810. Mutations in the gene *APOE* were tested using the HRM unit LightScanner a DNA microarray method for device BeadStation 500G. After statistical evaluation and correlation with historical data was found approximately the same incidence of mutant alleles in women and men. E4 allele correlated with increased levels of blood fats and cholesterol in both men and women, especially during the current impact of external risk factors. The study enabled the acquisition of a controlling group of the population for further genetic studies of *APOE* and confirmed the need for lifestyle modification to prevent the development of CAD, especially in predisposed persons.

Úvod. Gen *APOE* je polymorfní a má tři hlavní alely – APOE-E2, APOE-E3 a APOE-E4, kódující apolipoprotein E (ApoE) - hlavní lipoprotein chylomikronů a VLDLs (very low density lipoproteins). Alela E4 je asociována s vyšším rozvojem aterosklerózy, Alzheimerovy choroby a se zhoršenými kognitivními funkcemi, alela E2 naopak s nižší hladinou cholesterolu, s nižším rizikem rozvoje aterosklerózy a s nižším rizikem vzniku Alzheimerovy choroby, E3 je normální funkční alelou. Udržení fyziologické hladiny cholesterolu je nezbytné pro prevenci aterosklerózy KVCH, a proto varianty ApoE ovlivňují případný rozvoj těchto chorob a jejich následných komplikací.

Metodika. V rámci studie bylo vyšetřeno 800 žen a 800 mužů české populace (18-69 let). DNA byla izolována z bukalního stěru soupravou Flocked Swabs nebo z žilní krve pomocí kitu QIAmp DNA Minikit a přístroje pro semiautomatickou izolaci DNA QuickGene 810. Mutace genu *APOE* byly testovány metodou HRM analysis na přístroji LightScanner a metodou DNA Microarray (GoldenGate Genotyping Assay) na přístroji BeadStation 500G.

Výsledky. Po statistickém vyhodnocení a korelaci s anamnestickými údaji byl zjištěn přibližně stejný výskyt mutovaných alel u žen i u mužů. Alela E4 korelovala se zvýšenou hladinou krevních tuků a cholesterolu u mužů i žen (nad 35 let), zejména při současném působení dalších rizikových faktorů (hypertenze, kouření, nadváha/obezita a nedostatečná pohybová aktivita).

Závěr. Studie umožnila získání kontrolní skupiny populace pro další genetické studie *APOE* a potvrdila nezbytnost úpravy životního stylu jako prevence rozvoje aterosklerózy a KVCH, zejména u predisponovaných osob.

FRUKTOSA A METABOLICKÝ SYNDROM – NOVÉ POZNATKY A OTÁZKY**L. Kazdová, H. Malínská, M. Cahová, J. Trnovská, H. Seidlová, V. Škop***Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha***Úvod**

Přibližně do poloviny šedesátých let minulého století byly jednoduché cukry (glukóza, fruktóza) přijímané v potravě nebo vznikající intestinální digescí sacharidů v potravě považovány za rovnocenné a tedy i zaměnitelné zdroje energie. Vzrůstající spotřeba sacharózy (obsahuje glukózu a fruktózu v poměru 50:50) a používání vysokofruktózového kukuřičného/pšeničného sirupu v potravinářském průmyslu od r. 1970 vedlo v posledních letech ke zvýšenému zájmu o metabolické důsledky jejich zvýšené konzumace (Tappy and Lé 2010).

- ▶ Evropa: spotřeba sacharózy
rok 1800 – 8,1 kg / osobu / rok
rok 1970 – 35,4 kg / osobu / rok
rok 2002 – 45,3 kg / osobu / rok
- ▶ Spotřeba fruktózy
rok 1970 – 0,2 kg / osobu / rok
rok 1997 – 28 kg / osobu / rok

Klinické i experimentální studie ukázaly, že vysoká konzumace těchto sacharidů může mít řadu negativních důsledků, které se mohou podílet na vysoké prevalenci obezity, metabolického syndromu, diabetu a kardiovaskulárních nemocí. Dále bylo jednoznačně prokázáno, že komponentou zodpovědnou za negativní účinky sacharózy je fruktóza.

Zdroje fruktózy v potravě

Fruktóza je monosacharid, který se vyskytuje zejména v ovoci, medu a je součástí molekuly sacharózy (50% glukózy : 50% fruktózy). I když se zdá, že obsah fruktózy v běžné potravě je nízký a nemůže mít zřetelné negativní důsledky je třeba připomenout, že obsah fruktózy v jedné čokoládové tyčince je přibližně 25 g a v jednom litru Coca Coly 50 g. K vysokému nárůstu konzumace fruktózy došlo v 70. letech minulého století, kdy bylo v USA do potravinářského průmyslu zavedeno nové sladidlo zvané vysokofruktózový kukuřičný sirup (označovaný HFCS – High-Fructose Corn Syrup). V České republice je tento výrobek označován jako glukózový sirup. Vyrábí se enzymatickou izomerizací z kukuřičného nebo /pšeničného škrobu. Nízká výrobní cena, vyšší sladivost (174 %) při porovnání se sacharózou (100 %) a vhodné vlastnosti pro technologické zpracování při výrobě potravin (zabraňuje vysychání pečiva) vedly k jeho používání při výrobě „soft“ nápojů, džemů, jogurtů, pečiva a řady dalších výrobků, včetně slaných sušenek. V jablečné šťávě, která je používána pro výrobu ovocných nápojů, přes 60 % kalorií tvoří fruktóza. Bylo zjištěno, že zvýšená spotřeba sacharózy a kukuřičného sirupu úzce koresponduje se vzrůstající prevalencí obezity a to u dospělých i dětské populace (Bray 2008, International Sugar Organization 2008).

Vliv fruktózy na příjem potravy

Pokusy na dobrovolnících ukázaly, že podání potravy s vysokým podílem fruktózy zvyšuje následující den pocit hladu a vede ke zvýšenému příjmu potravy v porovnání s podáním potravy obsahující izokalorické množství glukózy. Ovlivnění příjmu potravy je důsledkem rozdílného vlivu fruktózy a glukózy na regulační systém pocitu nasycení.

Glukóza stimuluje sekreci inzulínu z pankreatu a leptínu z tukové tkáně a inhibuje sekreci ghrelinu z gastrointestinálního traktu. Tím jsou v centrálním nervovém systému stimulována centra sytosti a energetické homeostázy. Naproti tomu fruktóza neovlivňuje sekreci inzulínu, vzhledem k tomu, že beta-buňky pankreatu nemají fruktózový transportér GLUT 5, ani receptor leptínu a ghrelinu a pocit nasycení není fruktózou ovlivněn.

Rozdíly v metabolismu glukózy a fruktózy

Fruktóza je ze střeva transportována glukózovými transportéry GLUT 5 a difunduje do portální žíly transportéry GLUT 2. Na rozdíl od glukózy absorpce fruktózy z lumen střeva nevyžaduje hydrolyzu ATP, což usnadňuje její akumulaci v játrech. Většina glukózy resorbovaná ze střeva je transportována do cévního oběhu, kde zvyšuje glykémii a je využita v periferních tkáních jako energetický substrát nebo pro tvorbu glykogenových a lipidových rezerv. Naproti tomu fruktóza po absorpci ze střeva nezvyšuje krevní koncentrace fruktózy ani glukózy, je přiváděna portálním oběhem do jater kde probíhá její metabolická přeměna vzhledem k tomu, že ostatní buňky neexprimují fruktokinázu (Mayes 1993). Fruktóza v játrech je využita pro syntézu pyruvátu, laktátu, de novo syntézu triacylglycerolů a částečně je i oxidována na CO₂. Příčinou rozdílu v kvantitativní utilizaci fruktózy a glukózy v játrech je: 1) výrazně vyšší aktivita fruktokinázy fosforylující fruktózu než fosfotransferáz (glukokináza a hexokináza) fosforylujících glukózu, 2) fruktózo-1-P je přímo štěpen na triosy, tzn. „obchází“ fosfofruktokinázovou reakci, která je rychlost limitujícím krokem jaterního metabolismu glukózy. Fruktóza v játrech inhibuje oxidaci lipidů ve prospěch reesterifikace mastných kyselin a syntézy VLDL. Naproti tomu glukóza je v játrech využívána převážně pro tvorbu glykogenu.

Vysoká kapacita jater syntetizovat prekurzory triglyceridů - mastné kyseliny, glycerofosfát a triacylglyceroly a vydávat je ve formě VLDL triglyceridů do cirkulace je hlavní příčinou hypertriglyceridemického efektu vyvolaného zvýšeným přívodem fruktózy. Na rozdíl od glukózy není vysoká utilizace fruktózy v játrech, ovlivněna inzulínem a je zachována i za stavů, kdy utilizace glukózy ve tkáních je výrazně snížena, například při diabetu a hladovění (Rizkalla 2010).

Vliv fruktózy na dyslipidémii a ektopickou akumulaci lipidů

Zvýšená tvorba triacylglycerolů v játrech při konzumaci fruktózy zvyšuje výdej triacylglycerolů ve VLDL z jater do cirkulace a jejich transport do periferních tkání. Důsledkem je jejich zvýšená intracelulární akumulace ve svalech, myokardu, a v pankreatu. V těchto tkáních dochází k tvorbě toxických lipidových metabolitů, kterými jsou diacylglyceroly, ceramidy a acylové deriváty mastných kyselin. Jejich působením dochází k poruchám přenosu inzulínového signálu, ke snížené utilizaci glukózy a k inzulínové rezistenci (Shulman 200).

Negativní vliv fruktózy na nealkoholickou jaterní steatózu

V poslední době je věnována značná pozornost zvýšené akumulaci triglyceridů v játrech, která je definována jako zvýšení obsahu triglyceridů na 5 – 10 % hmotnosti jater. Na základě vysoké prevalence inzulínové rezistence u pacientů s jaterní steatózou a v řadě studií zjištěná akumulace lipidů v játrech u osob s metabolickým syndromem, je dnes jaterní steatóza považována za součást poruch provázející metabolický syndrom. U zdravých dobrovolníků dieta s obsahem 25 % celkové energie ve formě sacharózy, zvýšila hladiny jaterních enzymů AST a ALT již po 18 dnech podávání. Výsledky této studie jsou alarmující, vzhledem k tomu, že současný průměrný příjem fruktózy v USA činí 12 % celkového energetického příjmu a může dosahovat u některých osob až 15 %. V epidemiologické studii se ukázalo, že osoby s jaterní steatózou v porovnání s kontrolní skupinou nebo běžnou populací konzumovaly

dvojnásobné množství sladkých nápojů. V mechanismu negativních účinků fruktózy na jaterní steatózu a její další komplikace může hrát důležitou úlohu vyčerpání ATP (adenosin trifosfátu) při fosforylaci fruktózy na fruktózo-1-fosfát enzymem fruktokinázou, které je dáváno do souvislosti s rozvojem zánětu a progresí steatózy do steatohepatitidy (Bruynseels 1999).

Negativní vliv fruktózy na kardiovaskulární onemocnění

Fruktóza může zvyšovat riziko kardiovaskulárních poruch nejen mírným zvýšením krevního tlaku, zvýšenou tvorbou malých aterogenních lipoproteinových částic (LDL), ale i negativním vlivem na funkci endotelu v důsledku vystupňovaného oxidačního stresu a snížené dostupnosti oxidu dusnatého. Podle současných poznatků je vzestup hladin triglyceridů, zejména v postprandiální fázi z hlediska rizika kardiovaskulárních onemocnění srovnatelný s hypercholesterolemií (Fung 2009). Recentní studie navrhuje hypotézu, podle které spojnici mezi negativním účinkem fruktózy a zvýšeným rizikem kardiovaskulárních chorob, může být zvýšená hladina kyseliny močové v organismu (Nakagawa 2006). Svědčí pro to zjištěná korelace mezi konzumací fruktózy a hladinami kyseliny močové u populace v USA. Závažnost tohoto nálezu souvisí s tím, že kyselina močová snižuje endoteliální hladiny oxidu dusnatého, který udržuje cévy v permanentním stavu vasodilatace.

Faktory ovlivňující hypertriglyceridemický účinek sacharózy nebo fruktózy

Hypertriglyceridemický efekt indukovaný sacharóou nebo fruktozou může být modifikován řadou jiných nutričních. Konzumace lipidů s vysokým podílem satureovaných mastných kyselin potencovala hypertriglyceridemický efekt sacharózy nebo fruktózy (Perin et al. 1997). Naproti tomu zvýšený přívod polynenasycených mastných kyselin obsažených v olejích z mořských ryb zabránil sacharóou indukované hypertriglyceridemii. Rovněž věk může modifikovat triglyceridemickou odpověď na vysoký podíl sacharózy nebo fruktózy v dietě. U mladých potkanů krměných fruktozovou dietou jsme pozorovali nižší vzestup sérových koncentrací triglyceridů v porovnání s dospělými zvířaty, což může souviset s vysokou kapacitou tkání mladých potkanů využít triglyceridy pro oxidaci nebo ukládání do tělesných rezerv. Naproti tomu hypertriglyceridemický efekt vysokosacharóové diety byl výraznější u velmi starých potkanů (Divišová et al. 2000). V klinických studiích bylo zjištěno, že dalšími faktory, které zvyšují negativní důsledky sacharidy indukované hypertriglyceridemie je zvýšený BMI a dále přítomnost hypertriglyceridemie a hyperinzulinemie před podáváním diety s vysokým podílem sacharidů.

Hypertriglyceridemický efekt sacharózy nebo fruktózy závisí i na genetickém vybavení organismu. Dokladem toho jsou výsledky studií provedených na našem pracovišti. V devadesátých letech doc. MVDr. Vrána, DrSc. vyseletoval z konvenčního kmene laboratorních potkanů Wistar kmen potkanů s geneticky fixovanou hypertriglyceridemií.

Tento kmen na zvýšený příjem sacharóy v dietě citlivě reaguje zvýšením triglyceridemie o 80 %, zatímco u kontrolních potkanů stejná dieta zvyšuje triglyceridemii pouze o 30 %. Jiným dokladem genetického ovlivnění citlivosti k vysokosacharóové dietě je kmen potkanů Brown Norway, který byl vyšlechtěn z divoce žijících potkanů. U tohoto kmene ani vysoký podíl sacharózy v dietě (70 cal %) koncentraci sérových triglyceridů neovlivnil. Podobná situace se pravděpodobně vyskytuje i u populace – u zdravých dobrovolníků 10 % nereagovalo změnou triglyceridemie na přívod diety s vysokým podílem sacharózy.

Údaje o genetické náchylnosti k nutričně indukované hypertriglyceridemii u populace zatím chybí. V recentní studii analyzoval Erkkila a spol. u pacientů s prokázaným kardiovaskulárním onemocněním vliv polymorfizmu apolipoproteinu E na sacharóou indukované zvýšení triglyceridemie. Autoři zjistili, že hypertriglyceridemický efekt byl asociován s alelou ϵ_2 (Erkkila et al. 2007).

Možnosti ovlivnění negativních účinků vysokého podílu sacharózy nebo fruktózy v dietě

Zajímavým zjištěním je, že negativní důsledky diety s vysokým podílem fruktózy nebo sacharózy mohou být eliminovány kromě zvýšeného přívodu polynenasycených mastných kyselin, které snižují produkci triglyceridů v játrech a stimulují jejich utilizaci v periferních tkáních, též současným snížením tělesné hmotnosti nebo zvýšením tělesné aktivity. Pro tyto závěry svědčí výsledky studií, v nichž záměna tuku v dietě byla nahrazena nižším než izokalorickým množstvím sacharidů a studií, v nichž pacienti současně s přívodem vysokosacharózové diety zvýšili tělesný pohyb např. jednohodinovou rychlou chůzí.

Závěr

Vzrůstající konzumace fruktózy ve formě sacharózy (řepného nebo třtinového cukru), nebo vysokofruktóзовého kukuřičného sirupu, používaného v potravinářském průmyslu, zvyšují rizika negativních účinků fruktózy, ke kterým patří vzestup hladin triacylglycerolů, spolu s ektopickým ukládáním lipidů ve tkáních a dalšími negativními důsledky jako je inzulinová rezistence svalové a tukové tkáně, zhoršení glukózové tolerance, dysfunkce endotelu a řada dalších poruch. Studie z posledních let přinesly řadu závažných poznatků o metabolických efektech vysokého přívodu sacharózy nebo fruktózy.

Jaké hlavní poznatky týkající se doporučení bezpečného množství fruktózy v potravě z nich vyplývají?

- Obsah mono- a disacharidů v dietě by neměl přesáhnout 30kal %.
- Poměr škrobu k mono- a disacharidům by měl být vyšší než 50 : 50.
- Náhrada tuku v dietě sacharidy by měla být spojena se snížením kalorického příjmu.
- Negativní důsledky vyššího podílu sacharózy lze omezit zvýšením tělesné aktivity.

Pro doporučení bezpečných dávek chybí klinické, dobře kontrolované dlouhodobé studie, které by analyzovaly účinky fruktózy ve vztahu ke genetické náchylnosti, oxidačnímu stresu, chronickému zánětu a přispěly k nalezení bezpečného množství v potravě. Vzhledem k tomu, že fruktóza je součástí řady průmyslově vyráběných potravin, neexistují data o skutečné konzumaci fruktózy.

Studie byla podpořena MZ ČR – RVO („Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ 00023001“) a grantem GAČR P301/11/2418.

Literatura

- BRAY G. Am J Clin Nutr 2007; 86: 895-896.
BRUYNSEELS K., BERGANS N., GILLIS N., et al. NMR Biomed 1999; 12: 145-156.
DIVIŠOVÁ J., KAZDOVÁ L., CHVOJKOVÁ Š. Diabetologia 2000; 43 Suppl 1: A156.
ERKKILA AT., SCHWAB US., AGREN JJ., et al. Eur J Clin Nutr 2007; 61: 1094-1101.
FUNG TT., MALIK V., REYRODE KM. Am J Clin Nutr 2009; 89: 1037-1042.
INTERNATIONAL SUGAR ORGANIZATION. Sugar Year Book, London: ISO 2008.
MAYES PA. Am J Clin Nutr 1993; 58 Suppl: 54S-765S.
NAKAGAWA T., HU H., ZHARIKOV S., et al. Am J Physiol Renal Physiol 2006; 200: F625-F631.
PERIN N., KEELAN M., JAROCKA-CYRTA F., et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 1997; 173: G713-G720.
RIZKALLA SW. Nutrition and Metabolism 2010; 72:82-99.
SHULMAN GI. J Clin Invest 2000; 106: 171-176.
TAPPY L., LÉ KA. Physiol Rev 2010; 90: 23-46.

KATALASA A JEJÍ CHOVÁNÍ ZA RŮZNÝCH PATOFYZIOLOGICKÝCH STAVŮ

J. Kodydková, L. Vávrová, M. Kocík, A. Žák

IV. interní klinika I. LF UK a VFN v Praze

Katalasa (KAT, $H_2O_2 : H_2O_2$ – oxidoreduktasa, EC: 1.11.1.6) patří mezi nejdůležitější antioxidační enzymy a byla jedním z prvních zkoumaných enzymů vůbec. Své jméno získala roku 1900 podle svého katalytického působení na peroxid vodíku (Loew 1900). Primárně je KAT intracelulární enzym, kde u savců je v nejvyšších koncentracích obsažena v erythrocytech, játrech a příležitostně v ledvinách (Deisseroth & Dounce 1970). V tkáních je KAT hlavně v peroxisomech (Quan et al. 1986).

Lidský gen pro KAT izoloval a charakterizoval v roce 1986 Quan se svým kolektivem. Gen KAT je situován na 11. chromosomu (od 34460471 do 34493606 páru bazí) skupina p13 a je rozdělen na 13 exonů a 12 intronů (Quan et al. 1986).

Struktura

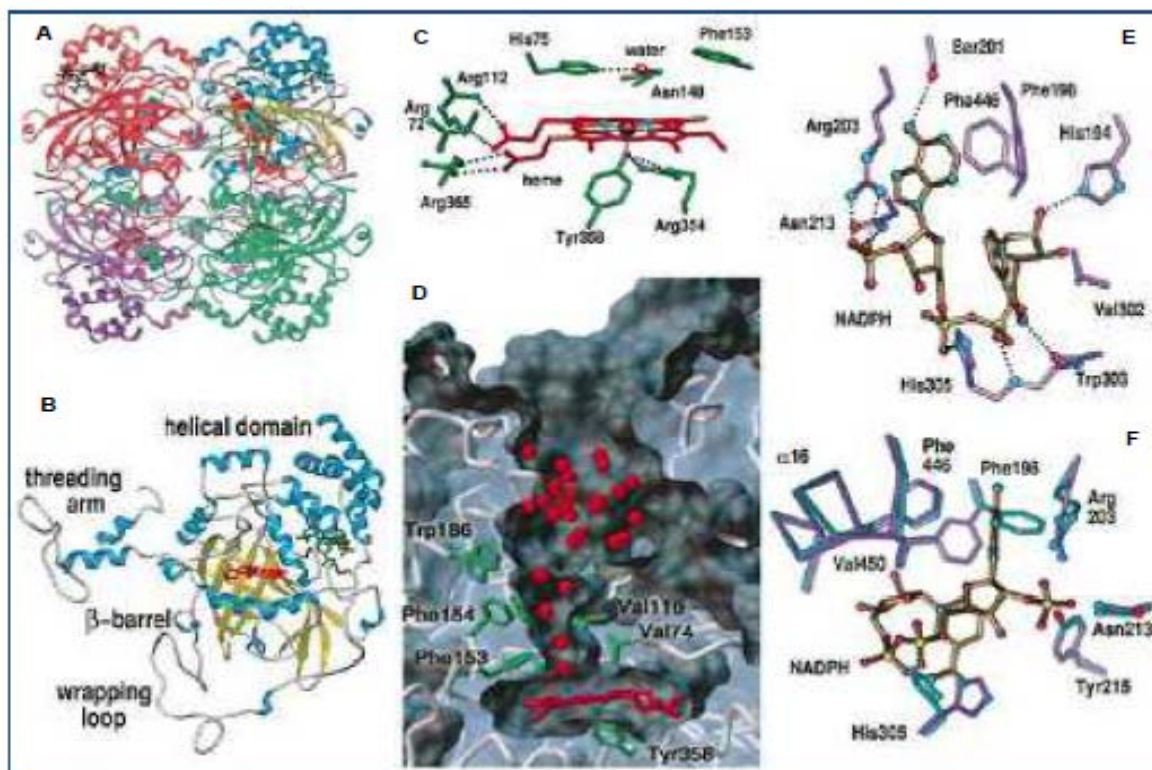
Lidská KAT (obrázek 1a) je tetramerní protein o celkové hmotnosti 244 kDa složený ze 4 identických podjednotek, každá o 69,7 kDa. Každá podjednotka KAT obsahuje 527 aminokyselinových zbytků, jednu hemovou skupinu s železitým iontem a pevně vázanou molekulu NADPH (Kirkman & Gaetani 1984, Ko et al. 2000, Safo et al. 2001). Teoreticky je možno každou podjednotku rozdělit do 4 domén: N-terminální rameno (zbytky 5-70), wrapping loop, β -soudek a doména 8 α -helixů (zbytky 155-207 a 440-501). Struktura KAT je silně hydratovaná, hydrofobními částmi struktury jsou oblast β -soudku a aktivní centrum molekuly (Putnam et al. 2000).

Aktivní centrum enzymu je lokalizováno uvnitř molekuly a je tvořeno hemovou prostetickou skupinou (obrázek 1c) – v tomto případě protoporfirinem IX s Fe^{3+} (Kirkman & Gaetani 2006). Na reaktivitě aktivního centra se podílí Tyr358 (donor elektronů), Arg72, Arg112 a Arg365. Další 4 aminokyselinové zbytky His218, Asp348, Arg354 a Tyr358 se podílejí na přenosu náboje v aktivním centru (Putnam et al. 2000).

Předpokládá se, že přístup k aktivnímu centru molekuly je umožněn 3 kanály: hlavní kanál (vertikální; obrázek 1d), malý kanál a kanál vedoucí od hemu k centrální dutině tetrameru. Všechny 3 kanály jsou docela těsné a tedy přístupné jen pro relativně malé molekuly (Switala & Loewen 2002).

Molekuly NADPH jsou vázány na povrchu molekuly CAT v dutině vytvořené mezi $\alpha 6$ a $\alpha 7$ helixy a β -soudkem. Předpokládá se, že NADPH (obrázek 1e, 1f) se váže k aminokyselinovým zbytkům His194, Arg203, Val302, Trp303 a His305 (Putnam et al. 2000, Chelikani et al. 2004). Největší afinitu k povrchu KAT má redukováná forma NADP – tedy NADPH. Afinita molekul klesá v pořadí $NADPH > NADH \gg NADP^+ > NAD^+$ (Kirkman & Gaetani 1984).

Zdravý erythrocyt obsahuje 1,31-2,71 μg CAT/mg hemoglobinu, což by odpovídalo koncentraci 6,6-13,7 μM na KAT vázaného NADPH (Kirkman & Gaetani 1984). Koncentrace volného NADPH v erythrocytech se pohybuje kolem 2 μM (Kirkman et al. 1987).

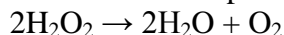


Obrázek 1.

A: struktura lidské katalasy; B: podjednotka lidské katalasy, helixy – modře, β -soudek -žlutě; C: Aktivní centrum molekuly; D: hlavní kanál; E, F: NADPH-vázací místo, NADPH - bronzově; heme – červeně; (podle Putnam et al. 2000).

Funkce

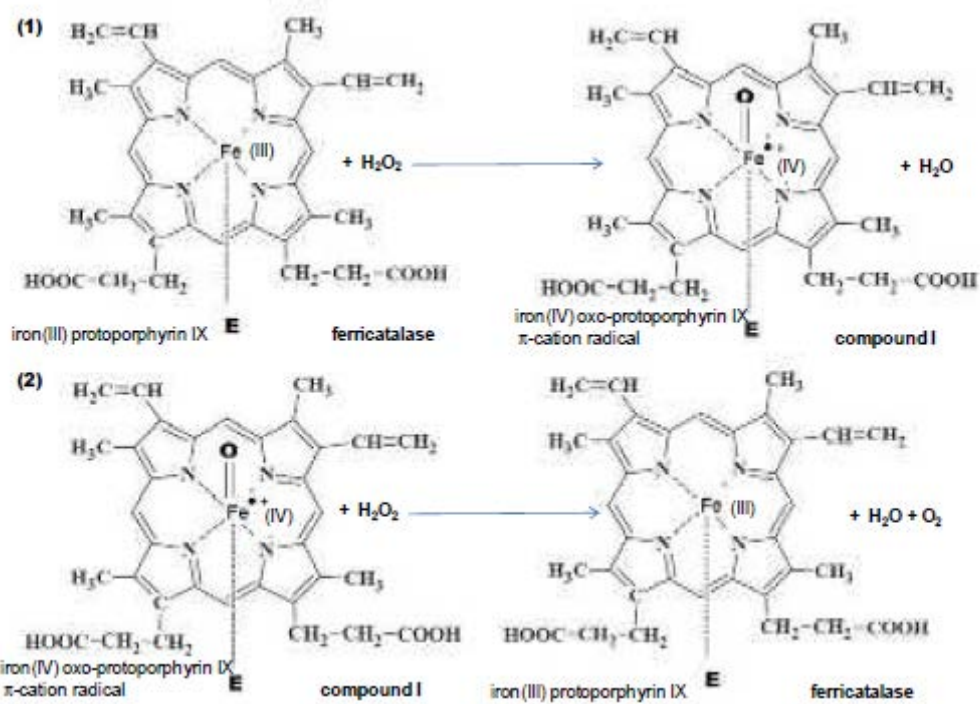
Hlavní funkcí KAT je katalýza odbourávání molekul peroxidu vodíku na vodu a kyslík.



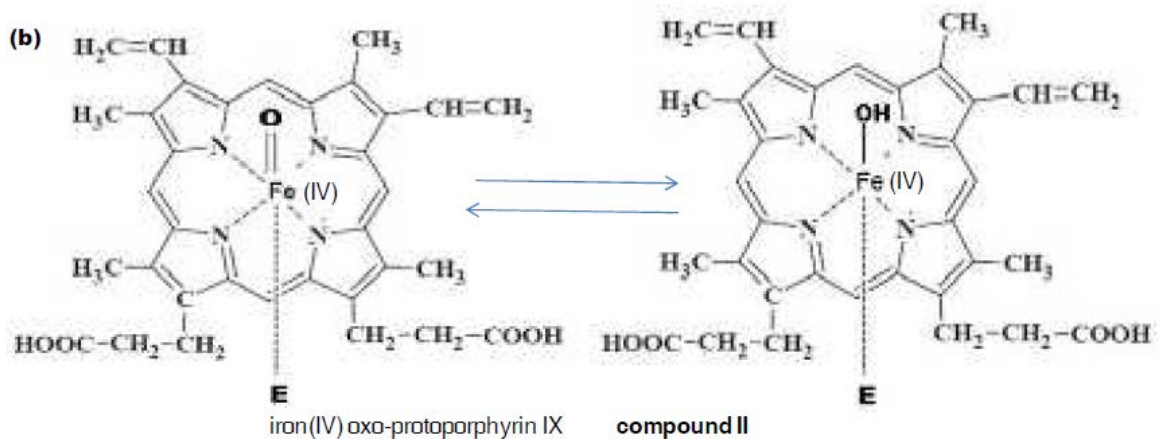
Všeobecně je akceptována teorie, že tato reakce probíhá ve dvou krocích (obrázek 2).

V prvním fázi probíhá reakce jedné molekuly peroxidu vodíku s železitým kationem protoporfirinové skupiny katalasy (ferricatalase). Při této reakci vzniká molekula vody a tzv. sloučenina-I (compound-I), což je forma katalasy obsahující π -kation radikál oxo-protoporfirinu s železem v oxidačním stavu 4+. V druhém kroku reaguje sloučenina-I s druhou molekulou peroxidu vodíku a vzniká tak kyslík, molekula vody a dochází k regeneraci protoporfirinového jádra katalasy (Kirkman et al. 1987, Almarsson et al. 1993, Kirkman Gaetani 2006).

Reakcí sloučeniny-I s jedním elektronem dochází k deaktivaci KAT a vzniku tzv. sloučeniny-II (compound-II). Sloučenina-II se může vyskytovat ve dvou formách (obrázek 3) a to buďto ve formě hydroxy- nebo oxo-protoporfirinu IX s železem v oxidačním stavu 4+ (Kirkman & Gaetani 2006, Rovira 2005).



Obrázek 2. Katalyzovaná dekompozice peroxidu vodíku prostřednictvím katalasy



Obrázek 3. Sloučenina-II – inaktivní forma katalasy

Je-li KAT dlouhodobě vystavena působení peroxidu vodíku, dochází k oxidaci na KAT vázaného NADPH a poklesu aktivity KAT až na 1/3 původní hodnoty (Kirkman & Gaetani 1987). NADPH tedy slouží jako ochrana KAT proti oxidativnímu působení peroxidu vodíku. Mechanismus, jakým NADPH působí, byl předmětem mnoha odborných článků. Předpokládá se, že NADPH jednak zabraňuje vytváření sloučeniny-II a dále i pomáhá při odstraňování již vytvořené sloučeniny-II (Kirkman & Gaetani 1987, Hillar & Nichols 1992, Almarsson et al. 1993, Olson & Bruice 1995, Kirkman et al. 1999, Rovira 2005, Kirkman & Gaetani 2006).

Při koncentracích peroxidu vodíku do 200mM je rychlost katalasou katalyzovaného rozkladu H_2O_2 přímo úměrná jeho koncentraci ($K_M = 80 \text{ mM}$; $V_{\text{max}} = 587 \mu\text{molH}_2\text{O}_2/\text{s} * \mu\text{mol}$

hemoglobinu). Kataláza je jeden z nejučinnějších známých enzymů (Switala & Loewen 2002, Kirkman & Gaetani 2006).

Katalasa může též katalyzovat peroxidaci alifatických alkoholů s krátkým řetězcem. Při koncentracích peroxidu vodíku pod 10^{-4} M převládá peroxidace, při vyšších koncentracích pak naopak dominuje dismutace peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Maté et al. 1999). In vivo může být peroxid vodíku odstraňován prostřednictvím 3 skupin enzymů, kromě katalasy jsou to ještě glutathionperoxidasy a peroxiredoxiny. Předpokládá se, že při nízkých koncentracích peroxidu vodíku hrají hlavní úlohu v jeho dekompozici peroxiredoxiny, doplňované glutathionperoxidasou. Při vysokých koncentracích peroxidu vodíku má dominantní postavení naopak KAT (Halliwell & Gutteridge 2007).

V roce 2003 Heck et al. ve své studii ukázali, že v keratinocytech je KAT schopná generovat reaktivní formy kyslíku jako odpověď na UV záření, přičemž míra této schopnosti je dána dávkou UV a koncentrací KAT (Heck et al. 2003).

Aktivita za různých patofyziologických stavů

Aktivita KAT byla v rámci mnohých studií sledována za různých patofyziologických stavů. Na IV. interní klinice 1. LF UK a VNF v Praze byly uskutečněny studie zabývající se antioxidační kapacitou u pacientů s onemocněními pankreatu [akutní (AP) a chronická pankreatitida (ChP), karcinom pankreatu (KP)], s metabolickým syndromem (MetS), depresí (DP), sepsí (SP) a karcinomem prsu.

U pacientů s KP v porovnání se zdravými kontrolami (KON) byly pozorovány signifikantně snížené hodnoty aktivit KAT (Kodydková et al. 2013). Na rozdíl od této studie, Fukui et al. (2004) ve své studii nepozoroval rozdílné hodnoty KAT mezi KP a KON. Ani výsledky studií na aktivitu KAT u pacientů s ChP nejsou konzistentní. Někteří autoři popisují snížené hodnoty (Quillot et al. 2005), jiní zase zvýšené hodnoty KAT (Szuster-Ciesielska et al. 2001a, Szuster-Ciesielska et al. 2001b) u pacientů s ChP v porovnání s KON. V některých studiích pak nebyly pozorovány žádné rozdíly v aktivitách KAT u ChP a KON (Fukui et al. 2004, Kodydková et al. 2013).

U pacientů s akutní pankreatitidou nebyly pozorovány rozdílné hodnoty erythrocytární KAT od zdravých kontrol (Chmiel et al. 2002, Vavrova et al. 2012). Aktivity KAT v séru byly pozorovány signifikantně vyšší u pacientů s AP než u KON (Goth 1989, Góth 1982, Szuster-Czielska et al. 2001a, Fukui et al. 2004).

Výsledky studií zabývajících se aktivitou KAT u pacientů s MetS nejsou konzistentní, publikovány byly studie, kde aktivita KAT u pacientů s MetS byla snížena ve srovnání s kontrolní skupinou (Koziróg et al. 2010, Vavrova et al. 2013), ale též studie, kde nebyl pozorován rozdíl mezi aktivitou KAT mezi pacienty s MetS a KON (Broncel et al. 2010, Pizent et al. 2010), či kde aktivita KAT byla zvýšená (Cardona et al. 2008a, 2008b). U pacientů pouze s jednou komponentou MetS – s obezitou (Viroonudomphol et al. 2000), hypertencí (Rodrigo et al. 2007) nebo insulinovou resistencí (Shin & Park 2006) byla též pozorována snížená aktivita KAT.

Výsledky aktivit KAT u pacientů s depresivní poruchou také nejsou jednotné. V některých studiích byly zjištěny zvýšené hodnoty KAT u pacientů s depresí (Szuster-Ciesielska et al. 2008, Galecki et al. 2009), jiní autoři nepozorovali rozdíly v aktivitách KAT u DP a KON (Bilici et al. 2001, Kodydkova et al. 2009). Z dalších neurodegenerativních poruch byla aktivita KAT sledována u pacientů se schizofrenií, kde snížení aktivity KAT publikovali Goth & Vitai (1996), naopak její zvýšení prezentovali Herken et al. (2001). U autistických osob byla též pozorována snížená aktivita KAT (Zoroglu et al. 2004).

Vzniklo též několik studií zabývajících se aktivitou KAT u pacientů v sepsi, septickém šoku či trpících syndromem akutního respiračního selhání (ARDS). Zvýšené hodnoty aktivit u pacientů v sepsi pozorovali ve svých studiích Warner et al. (1995), Leff et al. (1992 and

1993) a Kapoor et al. (2006), naopak ve studii Novák et al. (2010) byly nalezeny snížené hodnoty aktivity KAT u pacientů v sepsi. Bylo zjištěno, že pacienti v sepsi s ARDS mají vyšší aktivity KAT než ti bez ARDS (Leff et al. 1993). I když na druhou stranu nebyly pozorovány rozdíly v aktivitách KAT mezi pacienty s ARDS a zdravými (Metnitz et al. 1999).

Závěr

Katalasa se řadí mezi jeden z nejdůležitějších antioxidantních enzymů a jejím hlavním úkolem je odbourávání peroxidu vodíku při jeho vysokých koncentracích. Za různých patofyziologických stavů většinou dochází ke změnám v aktivitě katalasy.

Poděkování

Studie byla podporována výzkumnými projekty: (1) RVO-VFN 641265/2012 Ministerstva zdravotnictví České republiky; (2) PRVOUK-P25/LF1/2 Karlovy Univerzity v Praze.

LITERATURA

ALMARSSON Ö., SINHA A., GOPINATH E., BRUCE TC. Mechanism of One-Electron Oxidation of NADPH and Function of NADPH Bound Catalase. *J Am Chem Soc* 1993; 115: 7093-7102.

BILICI M., EFE H., KORUGLU MA., et al. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 2001; 64: 43-51.

CARDONA F., TÚNEZ I., TASSET I., et al. Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest* 2008a; 38: 510-515.

CARDONA F., TUNEZ I., TASSET I., et al. Similar increase in oxidative stress after fat overload in persons with baseline hypertriglyceridaemia with or without the metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2008b; 41: 701-705.

DEISSEROTH A., DOUNCE AL. Catalase: Physical and Chemical Properties, Mechanism of Catalysis, and Physiological Role. *Physiological Reviews* 1970; 50(3): 319-375.

CHELIKANI P., FITA I., LOEWEN PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004; 61: 192-208.

CHMIEL B., GRABOWSKA-BOCHENEK R., PISKORSKA D., et al. Red blood cells deformability and oxidative stress in acute pancreatitis. *Clin Hemorheol Microcirc* 2002; 27: 155-162.

FUKUI M., KANO H., TAKAMATSU Y., ARAKAWA Y. Analysis of serum catalase activities in pancreatic diseases. *J Gastroenterol* 2004; 39: 469-474.

GAŁECKI P., SZEMRAJ J., BIENKIEWICZ M., et al. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. *Pharmacol Rep* 2009; 61(3): 436-447.

GÓTH L., MÉSZÁROS I., NÉMETH H. Serum catalase enzyme activity in acute pancreatitis. *Clin Chem* 1982; 28: 1999-2000.

GÓTH L. Origin of serum catalase activity in acute pancreatitis. *Clin Chim Acta* 1989; 186: 39-44.

GOTH L., VITAI M. Hypocatalasemia in hospital patients. *Clin Chem* 1996; 42: 341-342.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. Free radicals in biology and medicine. Fourth edition, New York, Oxford University Press Inc. 2007; P., 123-124 and 347-348.

HECK DE., VETRANO AM., MARIANO TM., LASKIN JD. UVB Light Stimulates Production of Reactive Oxygen species. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278: 22432-22436.

HILLAR A., NICHOLLS P. A mechanism for NADPH inhibition of catalase compound II formation. *FEBS* 1992; 314: 179-182.

- HERKEN H., UZ E., OZYURT H., et al. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001; 6: 66-73.
- KAPOOR K., BASU S., DAS BK., BHATIA BD. Lipid peroxidation and antioxidants in neonatal septicaemia. *J Trop Pediatr* 2006; 52(5): 372-375.
- KIRKMAN HN., GAETANI GF. Catalase a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 4343-4347.
- KIRKMAN HN., GALIANO S., GAETANI GF. The function of Catalase-bound NADPH. *The journal of biological Chemistry* 1987; 262: 660-666.
- KIRKMAN HN., GAETANI GF. Mammalian catalase: venerable enzyme with new mysteries. *TRENDS in Biochemical Sciences* 2006; 32: 44-50.
- KO TP., SAFO MK., MUSAYEV FN., et al. Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2000; 56: 241-245.
- KODYDKOVÁ J., VÁVROVÁ L., ZEMAN M., et al. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clin Biochem* 2009; 42: 1368-1374.
- KODYDKOVÁ J., VÁVROVÁ L., STAŇKOVÁ B., et al. Changes in antioxidants and oxidative stress markers in pancreatic diseases. *Pancreas* 2013; 42: 614-621.
- KOZIRÓG M., POLIWICZAK AR., DUCHNOWICZ P., et al. Melatonin treatment improves blood pressure, lipid profile, and parameters of oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *J Pineal Res* 2011; 50: 261-266.
- LEFF JA., PARSONS PE., DAY CE., et al. Increased serum catalase activity in septic patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992, 146: 985-989.
- LEFF JA., PARSONS PE., DAY CE., et al. Serum antioxidants as predictors of adult respiratory distress syndrome in patients with sepsis. *Lancet* 1993, 341: 777-780.
- LOEW O. A new enzyme of general occurrence in organisms. A preliminary note. *Science* 1900; 11: 701-702.
- MATÉ MJ., ORTÍZ-LOMBARDÍA M., MARINA A., FITA I. Crystallization and preliminary structural results of catalase from human erythrocytes. *Acta Crystallographica Section D* 1999; D55: 1066-1068.
- METNITZ PG., BARTENS C., FISCHER M., et al. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1999; 25: 180-185.
- NOVAK F., VAVROVA L., KODYDKOVA J., et al. Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clin Exp Med* 2010; 10: 21-25.
- OLSON LP., BRUCE TC. Electron Tunneling and ab Initio Calculations Related to One-Electron Oxidation of NADPH Bound to Catalase. *Biochemistry* 1995; 34: 7335-7347.
- PUTNAM CHD., ARVAI AS., BOURNE Y., TAINER JA. Active and inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism. *Journal of Molecular Biology* 2000; 296: 295-309.
- Rodrigo R., Prat H., Passalacqua W., et al. Relationship between oxidative stress and essential hypertension. *Hypertens Res* 2007; 30: 1159-1167.
- ROVIRA C. Structure, Protonation State and Dynamics of Catalase Compound II. *Chem Phys Chem* 2005; 6: 1820-1826.
- QUAN F., KORNELUK RG., TROPAK MB., GRAVEL RA. Isolation and characterization of human catalase gene. *Nucleic Acid Res* 1986; 14: 5321-5335.
- QUILLOT D., WALTERS E., BONTZE JP., et al. Diabetes mellitus worsens antioxidant status in patients with chronic pancreatitis. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 1117-1125.
- SAFO MK., MUSAYEV FN., WU SH., et al. Structure of tetragonal crystals of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallographica Section D* 2001; D57: 1-7.
- SHIN MJ., PARK E. Contribution of insulin resistance to reduced antioxidant enzymes and vitamins in nonobese Korean children. *Clin Chim Acta* 2006; 365: 200-205.

- SWITALA J., LOEWEN PC. Diversity of properties among catalases. *Arch Biochem Biophys* 2002; 401: 145-154.
- SZUSTER-CIESIELSKA A., DANILUK J., KANDEFER-SZERSZEŃ M. Oxidative stress in blood of patients with alcohol-related pancreatitis. *Pancreas* 2001a; 22: 261-266.
- SZUSTER-CIESIELSKA A., DANILUK J., KANDEFER-SZERSZEŃ M. Alcohol-related cirrhosis with pancreatitis. The role of oxidative stress in the progression of the disease. *Arch Immunol Ther Exp* 2001b; 49: 139-146.
- VÁVROVÁ L., KODYDKOVÁ J., ZEMAN M., et al. Altered Activities of Antioxidant Enzymes in Patients with Metabolic Syndrome. *Obesity Facts* 2013; 6: 39-47.
- VÁVROVÁ L., KODYDKOVÁ J., MACÁŠEK J., et al. Oxidační stres v průběhu akutní pankreatitidy. *Klin biochem metab* 2012; 20(41): 188-193.
- WARNER A., BENCOSME A., HEALY D., VERME C. Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment. *Clin Chem* 1995; 41: 867-871.
- ZOROGLU SS., ARMUTCU F., OZEN S., et al. Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2004; 254: 143-147.

ENDOGLIN AND ATHEROGENESIS, *IN VIVO* AND *IN VITRO* STUDIES

P. Nachtigal, L. Zemanková, J. Rathouská, K. Ježková, M. Vařejčková, I. Němečková

Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Hradec Králové

Abstract

Endoglin (CD105, TGF- β type III receptor) seems to be potent modulator and/or marker of atherosclerosis. Tissue endoglin is expressed in endothelial cells, macrophages and smooth muscle cells in atherosclerotic plaques. Soluble endoglin can be measured in blood it was associated with hypercholesterolemia, endothelial dysfunction, hypertension and type II diabetes. Endoglin expression is related to expression and activity of eNOS, which is possible way how to affect endothelial dysfunction and atherogenesis. Endoglin expression is affected by inflammation and statin treatment both *in vivo* and *in vitro*. However, definitive role of endoglin in the process of atherosclerosis remains to be elucidated.

Introduction

Researchers discovered a new cytokine with the capability to transform fibroblasts in 1983 while studying epidermal and platelet derived growth factors in rat fibroblasts. Originally called sarcoma growth factor, TGF β was first isolated from neoplastic mouse tissue by Moloney sarcoma virus (Assoian et al. 1983). There are three TGF- β isoforms currently described in humans including TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3. There are a number of studies, showing that TGF- β 1 cytokine is the most important in atherosclerosis. TGF- β 1 is produced by both inflammatory and vascular cells and is expressed in human and mouse atherosclerotic plaques (Mallat et al. 2001).

TGF- β 1 is secreted in a latent form, where it is associated in a complex with latency-associated protein (LAP) and latent TGF- β 1 binding protein-1 (LTBP). Latent TGF- β 1 can be activated by a number of physical processes including heat, acid, reactive oxygen species, and biological processes such as proteolysis or integrin mediated activation. A number of proteases including plasmin, thrombin, elastase, MMP-2 and MMP-9 have been shown to be capable of directly activating latent TGF- β 1 *in vitro* (Jenkins 2008). 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), which has been widely associated with many pathological situations.

It has been demonstrated that endoglin plays a role in many pathological processes, including Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) (Llorca et al. 2007) and cancer angiogenesis (Perez-Gomez et al. 2010). More recently endoglin has been shown to have a role 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).

Several papers was also focused on endoglin (both tissue and soluble) role in atherosclerosis, inflammation and relation to endothelial NO – synthase.

The expression of tissue endoglin in blood vessels

Endoglin is expressed by endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages, in atherosclerosis related blood vessels. The expression of endoglin was very weak in normal non-atherosclerotic aortas. The only positivity was restricted to endothelial cells lining

adventitial microvessels. On the other hand, smooth muscle cells showed strong endoglin expression in advanced atherosclerotic plaques, where its expression appeared to be independent of SMC morphology and degree of leukocyte infiltration (Conley et al. 2000). Piao et al. demonstrated weak endoglin expression in normal arteries and its co-expression with TGF- β 1 and TGF- β RII in atherosclerotic lesions of the human aorta. They also showed higher expression of endoglin by macrophages, smooth muscle cells and endothelial cells in early lesions when compared with advanced lesions (Piao and Tokunaga 2006). Li et al. studied the expression of endoglin, CD31 (PECAM-1) and TGF- β 1 in human atherosclerotic plaques, focusing on the expression in neovessels in the atherosclerotic plaque (Li et al. 2006). They also showed weak or no expression in normal arteries but strong expression in atherosclerotic arteries, predominantly in microvessels of the lipid core with weak expression in macrophages and smooth muscle cells.

In contrast to humans and pigs, endoglin expression in mice is almost exclusively located in luminal endothelial cells in both non-diseased and atherosclerotic vessels, but not in smooth muscle cells and/or macrophages (Nachtigal et al. 2007, Nachtigal et al. 2009a, Rathouska et al. 2011).

Soluble endoglin

A soluble form of endoglin (s-endoglin) is generated by the cleavage of the extracellular domain from the intact membrane by MT1-MMP (membrane-type metalloprotease-1) and plays a central role in preeclampsia, a disease characterized by hypertension, endothelial dysfunction and severe alterations in placental circulation (Venkatesha et al., 2006). Increased levels of s-endoglin were also correlated with hyperglycemia, increased systolic blood pressure, pulse pressure, pressure wave velocity and electrocardiographically assessed left ventricular hypertrophy in patients with hypertension and diabetes mellitus with higher cardiovascular risk. These authors suggested that s-endoglin is an indicator of hypertension and diabetes-associated vascular pathologies as endothelial dysfunction and cardiovascular damage (Blazquez-Medela et al. 2010). In addition, levels of s-endoglin were associated with acute heart failure manifestation in patients (Kapur et al. 2010, Yanavitski and Givertz 2011). Blaha et al., they searched for a marker that would allow determination of the necessary intensity of therapy and frequency of future therapeutic interventions in patients with familial hypercholesterolemia (FH). They showed that s-endoglin levels are increased in patients with familial hypercholesterolemia when compared with the control group. In addition, s-endoglin levels were significantly lower after a series of extracorporeal eliminations, more after rheophereses when compared to LDL-aphereses (Blaha et al. 2008). Surprisingly, reduced levels of s-endoglin did not correlate with cholesterol levels. Since s-endoglin levels were reduced together with CRP levels and sCD40 levels, they suggested that reduced s-endoglin levels might be related to improvement of endothelial dysfunction and decreased activity of the immune system after removal of atherogenic substances during these extracorporeal eliminations (Blaha et al. 2008).

Endoglin and eNOS

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is a key enzyme responsible for the production of NO by endothelium. Its expression and activity is very important with respect to endothelial protection, and its decreased expression is related to the development of endothelial dysfunction, the key step in atherogenesis. There are several papers showing relation between endoglin and eNOS both *in vitro* and *in vivo*.

Jerkic et al. nicely demonstrated that endoglin expression is strongly related to eNOS expression in mice. They showed decreased levels of eNOS in endoglin haploinsufficient mice (Eng^{+/-}), which resulted in impaired endothelium-dependent vasodilation in these mice

(Jerkic et al. 2004). Moreover, eNOS derived NO seems to play a major role in endoglin-dependent angiogenesis (Jerkic et al. 2006). In addition, Toporsian et al. found that endoglin is an essential component of eNOS activation complex, stabilizes eNOS protein, and facilitates the association of eNOS with Hsp90, which indicates the crucial role of endoglin in endothelial cell function, and regulation of local vascular tone (Jerkic et al. 2006). Another *in vitro* study, published by Santibanez et al., clearly showed the potential mechanism how endoglin upregulates eNOS expression and function. They showed that endoglin increases Smad2 levels, Smad2 phosphorylation and Smad2 stability, which results in increased eNOS expression both in the absence and/or in the presence of exogenous TGF- β 1 in endothelial cells (Santibanez et al. 2007).

Despite the fact that the above-mentioned ideas were studied in relation to Hereditary hemorrhagic telangiectasia, it is of course of interest to evaluate the same relationship between endoglin, eNOS, endothelial function and/or dysfunction in atherogenesis.

Endoglin and eNOS in mouse atherosclerosis

Our previous papers in mouse models of atherosclerosis showed that endoglin and eNOS are affected in very similar way and simultaneously with reduced aortic atherosclerotic plaques after statin treatment. Moreover, these proteins are strongly colocalized in aortic endothelium (Nachtigal et al. 2009b). In general, atorvastatin was able to decrease cholesterol levels, plaque size and soluble endoglin levels and simultaneously increase expression of endoglin and eNOS in aorta (Nachtigal et al. 2009a, Rathouska et al. 2011). Moreover, atorvastatin decreased plaque size and increased endoglin and eNOS beyond its lipid lowering effects (Vecerova et al. 2012).

We concluded from those results that increased eNOS and endoglin expression could be important for statins effects and their benefit in atherosclerosis.

Endoglin and the role in inflammation

Despite several studies showing positive relation between endoglin with atheroprotective eNOS, more recently it has been demonstrated that endoglin could promote inflammation and transmigration of leukocytes during inflammation (Rossi et al. 2013). Rossi et al demonstrated, that endoglin is highly expressed in endothelium of venules and facilitate transmigration of leukocytes from circulation into the inflammatory sites in cooperation with α 5 β 1 integrin, and after stimulation with chemokines like CXCL12. Moreover, they showed that inflammation results in migration of endoglin from the surface of the cells into the intercellular spaces where it participates on leukocyte transmigration (Rossi et al. 2013).

However, it must be point out that situation in venules is far from situation in atherosclerosis prone vessels, like in arteries. Moreover, they did not evaluate possible role endoglin and eNOS in this process because eNOS is known to be able to inhibit leukocyte transmigration during atherogenesis. Therefore, the possible role of endoglin supporting inflammation in atherosclerosis remains to be elucidated.

Endoglin, inflammation, statins and HUVECs

Despite of the fact we demonstrated that statins increase endoglin and eNOS and reduce atherosclerosis, direct link between these effects has not been provided yet. Our latest results (unpublished results) showed that TNF α treatment (simulation of inflammation *in vitro*) reduce both endoglin and eNOS expression in HUVEC cells. In addition, statin treatment reversed this reduction and both endoglin and eNOS were upregulated, which is in line with our *in vivo* mice studies.

These unfinished results at least indicate that endoglin and eNOS are strongly related with respect to statin treatment suggesting that statin might increase atheroprotective eNOS via endoglin or its endoglin related signaling.

Conclusion

The expression of tissue and soluble endoglin in atherogenesis was confirmed in both human and animal atherosclerosis. Endoglin seems to be affected during the atherogenic process by various stimuli including cholesterol, lesion progression and statin treatment. Anyway, definitive role of endoglin on the process of atherosclerosis remains to be elucidated.

Acknowledgment

This study was supported by grants from The Grant Agency of Charles University in Prague number 300811/C and number 300911/C, UNCE 33/2012 and by the grant SVV/2013/267003.

References

- ASSOIAN RK., KOMORIYA A., MEYERS CA., et al. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983; 258: 7155-7160.
- BLAHA M., CERMANOVA M., BLAHA V., et al. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2008; 197: 264-270.
- BLAZQUEZ-MEDELA AM., GARCIA-ORTIZ L., GOMEZ-MARCOS MA., et al. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* 2010; 8: 86.
- CONLEY BA., SMITH JD., GUERRERO-ESTEO M., et al. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2000; 153: 323-335.
- DE VIVO A., BAVIERA G., GIORDANO, D., et al. Endoglin, PIGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87: 837-842.
- GRAINGER DJ. TGF-beta and atherosclerosis in man. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 213-222.
- JENKINS G. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1068-1078.
- JERKIC M., RIVAS-ELENA JV., PRIETO M., et al. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J* 2004; 18: 609-611.
- JERKIC M., RODRIGUEZ-BARBERO A., PRIETO M., et al. Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 845-854.
- KAPUR NK., HEFFERNAN KS., YUNIS AA., et al. Usefulness of soluble endoglin as a noninvasive measure of left ventricular filling pressure in heart failure. *Am J Cardiol* 2010; 106: 1770-1776.
- LI C., MOLLAHAN P., BAGUNEID MS., et al. A comparative study of neovascularisation in atherosclerotic plaques using CD31, CD105 and TGF beta 1. *Pathobiology* 2006; 73: 192-197.
- LLORCA O., TRUJILLO A., BLANCO FJ., BERNABEU C. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol* 2007; 365: 694-705.
- LOPEZ-NOVOA JM., BERNABEU C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299: H959-H974.

- MALLAT Z., GOJOVA A., MARCHIOL-FOURNIGAULT C., et al. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 2001; 89: 930-934.
- NACHTIGAL P., POSPISILOVA N., JAMBOROVA G., et al. Endothelial expression of endoglin in normocholesterolemic and hypercholesterolemic C57BL/6J mice before and after atorvastatin treatment. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 767-773.
- NACHTIGAL P., POSPISILOVA N., VECEROVA L., et al. Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *J Atheroscler Thromb* 2009a; 16: 265-274.
- NACHTIGAL P., VECEROVA L., POSPISILOVA N., et al. Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 2009b; 24: 1499-1506.
- PEREZ-GOMEZ E., DEL CASTILLO G., JUAN FRANCISCO S., et al. The role of the TGF-beta coreceptor endoglin in cancer. *ScientificWorldJournal* 2010; 10: 2367-2384.
- PIAO M., TOKUNAGA O. Significant expression of endoglin (CD105), TGFbeta-1 and TGFbeta R-2 in the atherosclerotic aorta: an immunohistological study. *J Atheroscler Thromb* 2006; 13: 82-89.
- RATHOUSKA J., VECEROVA L., STRASKY Z., et al. Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacol Res* 2011; 64: 53-59.
- ROSSI E., SANZ-RODRIGUEZ F., ELENO N., et al. Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* 2013; 121: 403-415.
- SANTIBANEZ JF., LETAMENDIA A., PEREZ-BARRIOCANAL F., et al. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 2007; 210: 456-468.
- TEN DIJKE P., HILL CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 265-273.
- VECEROVA L., STRASKY Z., RATHOUSKA J., et al. Activation of TGF-beta receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice. *J Atheroscler Thromb* 2012; 19: 115-126.
- VENKATESHA S., TOPORSIAN M., LAM C., et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006; 12: 642-649.
- YANAVITSKI M., GIVERTZ MM. Novel biomarkers in acute heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2011; 8: 206-211.

VÝZNAM NECHOLESTEROLOVÝCH STEROLŮ JAKO NOVÝCH RIZIKOVÝCH FAKTORŮ KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ

M. Vecka, A. Žák, M. Zeman

IV. interní klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Souhrn

Limitované možnosti predikce ICHS vedou v současné době k definici nových rizikových faktorů, které zahrnují molekulárně-genetické ukazatele i nové analyty detekované moderními analytickými metodami. Je známo, že během léčby statiny přetrvává u části léčených závažné reziduální riziko ICHS. Za část reziduálního rizika odpovídají vyšší koncentrace TAG a HDL-cholesterolu. Vysoká hladina bazální syntézy cholesterolu (vysoké koncentrace prekurzorů cholesterolu) a nízká absorpce cholesterolu (nízké koncentrace fytosterolů) jsou spojeny s větším profitem ze statinové léčby, kdežto obráceně nastavené parametry homeostázy cholesterolu jsou příznačné pro jedince s KVO. Vztah mezi úrovní absorpce fytosterolů a diabetes mellitus byl již také prokázán.

Absorpce fytosterolů je zprostředkována aktivitou sterolového kotransportéru ABCG5/G8, lokalizovaného v kartáčovém lemu enterocytů a žlučovém pólu hepatocytů. U osob, které mají zvýšený *pool* cholesterolu a fytosterolů (jejich oxidačních produktů) v důsledku snížené aktivity ABCG5/G8, je metabolismus necholesterolových sterolů odlišný, a to jak v důsledku zvýšeného příjmu exogenního cholesterolu a/nebo přímého toxického působení fytosterolů (resp. oxidačních produktů, které mohou mít cytotoxické účinky).

Experimentální modely naznačují souvislost mezi endoteliální dysfunkcí, zvýšeným krevním tlakem a hladinami fytosterolů. Retrospektivní studie sice prokázaly účinnost statinů pro zastavení progresu degenerativní stenózy aorty, nicméně prospektivní studie poskytují kontroverzní výsledky. Studie SEAS neprokázala významný vliv statinů na progresi stenózy aorty a další studie ASTRONOMER tato data potvrdila.

Závěrem lze říci, že sledování koncentrace necholesterolových sterolů (prekurzorů cholesterolu, fytosterolů, resp. jejich oxidační produkty) se uplatňují v etiologii a patogeneze lidské aterosklerózy, minimálně u osob se sníženou aktivitou ABCG5/G8. Terapeutické implikace by mohly zahrnovat na straně jedné výběr jedinců, u kterých podávání fytosterolů může zhoršovat úroveň kardiovaskulárního rizika, případně eliminovat prospěch z kontroly konvenčních kardiovaskulárních rizikových faktorů, a na straně druhé pacienty, kteří z léčby statiny výrazně profitují.

Klíčová slova: prekurzory cholesterolu, fytosteroly, riziko ICHS, léčba hypercholesterolémie

Úvod

Kardiovaskulární onemocnění přispívají zhruba z 50 % k morbiditě a mortalitě běžné populace a téměř z 80 % k mortalitě a morbiditě diabetiků. Koncentrace celkového (TC) a LDL cholesterolu (LDL-C) jsou základními ovlivnitelnými rizikovými faktory (RF) ischemické choroby srdeční (ICHS), resp. jejich ekvivalentů. Primárním cílem hypolipidemické léčby je snížení koncentrace LDL-C. Relativní riziko (RR) ICHS stoupá s koncentrací LDL-C, přičemž v koncentračním pásmu LDL-C od 1,0 do 4,9 mmol/l se RR ICHS zvýší téměř 4-krát. Je známo, že pouze 25 % osob se nachází v kategorii vysokého rizika (Greenland 2001). Ve skupině pacientů středního věku (< 55 let bez předchozí anamnézy ICHS) po 1. atace akutního infarktu myokardu je 10 % charakterizováno vysokým rizikem, 20 % středním rizikem a zbývajících 70 % spadá do kategorie nízkého rizika, kteří

nejdou indikováni k hypolipidemické léčbě (Akosh 2003). Z výše uvedeného vyplývají limitované možnosti predikce ICHS (Welsh 2008) i snaha definovat nové RF, jako např. subfrakce lipoproteinových (LP) tříd (Carmena 2004), nové sloučeniny (Hu 2009) a polymorfismy genů pro apolipoproteiny nebo specifické transportéry lipidových molekul (Mangravite 2007, Chasman 2004).

Z publikovaných metaanalýz statinových studií vyplynulo, že závislost mezi relativním poklesem rizika kardiovaskulárních onemocnění (KVO) a výchozími koncentracemi TC a LDL, ač statisticky signifikantní, není silná. Je známo, že i přes léčbu statiny přetrvává závažné reziduální riziko ICHS. Část reziduálního rizika jsou důsledkem zvýšených koncentrací triacylglycerolů (TAG) a poklesu koncentrace HDL-cholesterolu (HDL-C). Nicméně není přesně známo, jakou míru reziduálního rizika ICHS lze eliminovat úpravou patologických koncentrací TAG a HDL-C.

Další část reziduálního rizika při léčbě statiny souvisí s dysregulací vztahů mezi absorpcí cholesterolu, jeho syntézou a exkrecí, které jsou za fyziologického stavu velmi těsně regulovány. Bylo zjištěno, že krátkodobá léčba statiny je spojena s poklesem koncentrace cholesterolu a necholesterolových sterolů (NCS). Střednědobá léčba statiny ukazuje, přes trvalý snížení celkového (TC) a LDL-cholesterolu (LDL-C) vzestup koncentrace NCS (Law 2000, Miettinen 2003). Předpokládá se, že pokles syntézy cholesterolu v důsledku léčby statiny je spojen s poklesem exkrece cholesterolu a zpětně-vazebným zvýšením absorpce cholesterolu a fytosterolů. Tyto změny mohou mít klinický význam. Vzestup absorpce cholesterolu je sledován vzestupem koncentrace fytosterolů a jejich zvýšenou koncentrací v aterosklerotických plátech prokazovaných při endarterektomii. Další význam souvisí s rozdílnou odpovědí na léčbu statiny. Pacienti se sníženými parametry absorpce cholesterolu a *vice versa* se zvýšenou syntézou cholesterolu mají vyšší míru snížení koncentrace TC a LDL-C spolu s markery syntézy cholesterolu. Naopak pacienti se sníženou odpovědí na léčbu statiny mají zvýšené koncentrace TC a LDL-C v důsledku zvýšené absorpce cholesterolu. Výsledky studie 4S ukazují, že simvastatin efektivněji syntézu cholesterolu u osob s vyšší bazální syntézou a snižuje koncentrace TC a LDL-C méně výrazně než syntézu (Miettinen a Gylling 2002).

V poslední době se pozornost obrací také na jednotlivé komponenty homeostázy cholesterolu ve vztahu k úpravě vysokých koncentrací LDL-C a ovlivnění rizika ICHS. Je například známo, že větší profit ze statinové léčby mají pacienti s vysokou bazální syntézou cholesterolu spíše než jedinci s jeho zvýšenou absorpcí (Miettinen et al. 2000). Bližší pohled na metabolismus cholesterolu je ovšem spojen s nutností analyzovat i látky podobné cholesterolu, tzv. necholesterolové steroly, mezi které řadíme biosyntetické prekurzory cholesterolu a rostlinné steroly (fytoosteroly). Analýza fytosterolů usnadňuje pochopení stavu homeostázy cholesterolu, zpřesňuje výběr pacientů profitujících z hypocholesterolemické léčby a pomáhá poznat patogenetické působení fytosterolů i jejich oxidovaných produktů na úrovni cévní stěny. Tyto látky vstupují i do dalších metabolických drah, jež mohou mít vliv na patogenetické mechanismy spojené s rozvojem KVO.

Význam necholesterolových sterolů jako nových rizikových faktorů ICHS

Biosyntéza a absorpce cholesterolu

V klinické praxi se pro hodnocení úrovně biosyntézy a absorpce vedle přímých ukazatelů používají metodicky snadnější přístupy hodnotící nepřímé markery. Plazmatické koncentrace prekurzorů cholesterolu (squalen, latosterol, desmosterol, $\Delta 8$ -cholestenol) jsou nepřímým markerem syntézy cholesterolu *de novo* a stanovení plazmatických koncentrací fytosterolů (především kampesterolu, β -sitosterolu a brassicasterolu) se používá jako nepřímý ukazatel absorpce cholesterolu. Někteří autoři preferují stanovení cholestanolu (Silbernagel 2013b),

protože vztah kampesterolu a β -sitosterolu k absorpci cholesterolu je někdy zpochybňován (Jakulj 2013).

Populace se zvýšeným dietním přísunem fytoosterolů mají nižší riziko vzniku ICHS, např. vegetariáni (Craig 2009), ovšem některé epidemiologické studie spojily zvýšené plazmatické hladiny fytoosterolů se zvýšeným rizikem ICHS (Sudhop 2002, Assmann 2006). Odpověď organismu na přísun fytoosterolů nebo podávání ezetimibu, látek používaných k potlačení resorpce exogenního cholesterolu, je závislá na poměru lathosterol/kampesterol (Thuluva 2006), parametrů odrážejícího úroveň biosyntézy cholesterolu i absorpce sterolů. Absorpce sterolů v enterocyty je mimo jiné řízena aktivitami transportních proteinů (ATP vázajících transportních proteinů, *ATP-binding cassette transportes*) ABCG5/G8 a (protein 1 podobný Niemanovu-Pickovu proteinu C1, *Niemann-Pick C1 like 1 protein*) NPC1L1. Hypercholesterolemičtí pacienti s D19H i T400K polymorfismy ABCG5/G8 mají vyšší riziko rozvoje ICHS (Koeijvoets 2009), T400K polymorfismus má vztah i k odpovědi jedince na intervenci fytoosterolů (Plat 2005). Teupser a spol. prokázali spojitost mezi geneticky podmíněnou absorpcí fytoosterolů a rizikem ICHS (Teupser 2010), podobné nálezy jsou známy i pro diabetiky (Weingärtner 2011b). Polymorfismus ABCG8 (D19H) má vztah k riziku cholesterolové cholelitiázy i ke koncentraci TC a LDL-C (Stender 2011, Lammert 2008).

Některé klinické studie (Framingham Offspring Study) prokázaly, že pacienti s KVO mají vyšší markery resorpce cholesterolu a nižší ukazatele jeho syntézy ve srovnání se zdravými osobami (Nathan 2009, Weingärtner 2011a). Pokus o metaanalýzu takových studií ovšem ukázal, že neexistuje asociace mezi zvýšenými koncentracemi fytoosterolů (jako ukazatelů absorpce exogenního cholesterolu) a zvýšeným KV rizikem pro obecnou populaci. Sledované studie byly ovšem značně nehomogenní, co se týče adjustací na různé proměnné (Genser 2012).

Je zajímavé, že polymorfismus rs657152 v intronu I ABO lokusu také ovlivňoval koncentrace fytoosterolů u pacientů ve studii KORA (Teupser 2010). Asociace tohoto polymorfismu s kardiovaskulárním rizikem byla potvrzena v několika studiích (Silbernagel 2013a, 2013b). Přímý vztah krevních skupin k hypercholesterolémii nebyl v recentních studiích často zkoumán, známé jsou pouze výsledky některých asociačních studií (Teslovich 2010, Chasman 2009).

Toxicita fytoosterolů a jejich oxidovaných analog

U podskupiny osob, která má geneticky podmíněný zvýšený *pool* cholesterolu a fytoosterolů (resp. jejich oxidačních produktů) v důsledku snížené aktivity sterolového kotransportéru ABCG5/G8, lokalizovaného v kartáčovém lemu enterocytů a žlučovém pólu hepatocytů, je metabolismus necholesterolových sterolů odlišný, a to jak v důsledku zvýšeného příjmu exogenního cholesterolu, tak i v důsledku možného přímého toxického působení fytoosterolů (jak nativních molekul, tak jejich oxidativně modifikovaných analog) (Hidaka 1990).

Malá množství oxidovaných fytoosterolů (oxyfytoosterolů) jsou obsažena již v potravě (Grandgirard 2004a). Zvýšené koncentrace oxyfytoosterolů byly zjištěny v séru, játrech i aortách u apoE(-/-) myší (Tomoyori 2004). U zdravých lidí se v plazmě vyskytují v měřitelných koncentracích (Grandgirard 2004b). *In vitro* studie naznačují cytotoxické účinky oxyfytoosterolů podobné jako u oxysterolů (Adcox 2001). Na vztah oxyfytoosterolů k rozvoji aterosklerózy není jednotný názor; existuje pouze několik studií na zvířecích modelech s různými výsledky. U apoE(-/-) myší nebyly prokázány genotoxické účinky oxyfytoosterolů (Lea 2004) ani jejich vliv na progresi aterosklerózy u potkanů (Tomoyori 2004). Na druhé straně dieta se zvýšeným obsahem oxyfytoosterolů zvyšovala zastoupení těžších aterosklerotických lézí u LXR(+/-) myší. Oxyfytoosteroly navíc stimulovaly produkci MCP1 (marker endoteliální dysfunkce) lidských endoteliálních buněk koronárních arterií (Theuwissen 2008). U linií jaterních buněk byla toxicita oxidovaných derivátů fytoosterolů

prokázána pro stigmasterol (O'Callaghan 2010), kampesterol, dihydrobrassicasterol, (O'Callaghan 2013) i pro β -sitosterol (Ryan 2005).

Fytosteroly jako dietní doplňky

Dietní přísun fytosterolů je řádově srovnatelný s příjmem cholesterolu. Fytosteroly jsou ovšem absorbovány s daleko menší účinností než cholesterol (až o dva řády), takže i zvýšený příjem v rozmezí 1-3 g/den nezvýší podstatně jejich plazmatické koncentrace. Denní příjem fytosterolů v tomto rozmezí sníží hladinu LDL-C o cca 15 %, přičemž další zvyšování příjmu nevede k dalšímu poklesu LDL-C (Vecka 2007).

Indikace fytosterolů jako dietních doplňků ke snížení koncentrací TC a LDL-C je velmi populární, ačkoli po suplementaci fytosteroly nebylo prokázáno snížení počtu kardiovaskulárních příhod (Weingärtner 2009). Dlouhodobá suplementace fytosterolů u pacientů s mírnou hypercholesterolémií sice neprokázala vliv polymorfismů proteinů ABCG5/G8 na snižování hladin cholesterolu, ale byl popsán vztah těchto polymorfismů k IMT (Gylling 2009).

Vliv fytosterolů na kardiovaskulární systém

Fytosteroly *per se* způsobují u experimentálních zvířat endoteliální dysfunkci (Weingärtner 2008), přičemž úloha oxidovaných metabolitů jak cholesterolu, tak fytosterolů v těchto procesech není zcela jasná. Vaskulární depozita NCS, ve srovnání s cholesterolem, způsobují zvýšenou oxidaci a uvolňování kyslíkových radikálů (Plat 2001). Fytosteroly se akumulují v aortálních chlopních i u jedinců, kteří mají normální koncentrace fytosterolů v plazmě (Helske 2008). Dosavadní znalosti ukazují, že degenerativní stenóza aorty a aterosklerotické procesy mají (alespoň v počátečním stádiu) podobné etiologické faktory i patogenezi. Retrospektivní studie sice prokázaly účinnost statinů pro zastavení progresu degenerující stenózy aorty, nicméně prospektivní studie poskytují spíše kontroverzní výsledky. Velká randomizovaná studie SEAS neprokázala významný vliv statinů na progresi stenózy aorty a další, novější, studie ASTRONOMER její výsledky potvrdila (Novo 2011).

Na vztah fytosterolů a krevního tlaku (TK) není jednotný názor; klinické studie, na rozdíl od experimentálních, neprokázaly zvýšení TK po podávání fytosterolů (Jenkins 2008, Vissers 2008, Naito 2000).

Závěr

Hledání nových rizikových faktorů ICHS by mohlo pomoci k dalšímu poznání patofyziologie ICHS i k upřesnění hypolipidemické léčby rizikových osob. Některé nálezy naznačují roli fytosterolů (a jejich oxidačních produktů) v etiologii a patogenezi lidské aterosklerózy, minimálně u rizikových jedinců (se sníženou aktivitou kotransportéru ABCG5/G8) (obr. 1). Zkoumání metabolismu fytosterolů může také pomoci při posuzování problému, zda dietní opatření (zvýšený příjem fytosterolů) u jedinců s hypercholesterolémií, nezvyšují paradoxně riziko ICHS. Další sledování by mělo být zaměřeno na otázku, zda rizikovým faktorem ICHS je zvýšená absorpce exogenního cholesterolu *per se*, nebo vlastními rizikovými faktory jsou fytosteroly, resp. jejich oxidačně modifikované molekuly.

Studie byla podporována výzkumnými projekty: (1) RVO-VFN 641265/2012 Ministerstva zdravotnictví České republiky; (2) PRVOUK-P25/LF1/2 Karlovy Univerzity v Praze.

Literatura

- ADCOX C., BOYD L., OEHLER L., et al. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 2090-2095.
- AGREN JJ., TVRZICKÁ E., NENONEN MT., et al. *Br J Nutr* 2001; 85: 137-139.
- AHOTUPA M., RUUTU M., MÄNTYLÄ E. *Clin Biochem* 1996; 29: 139-144.
- AKOSAH KO., SCHAPER A., COGBILL C., SCHOENFELD P. *JACC* 2003; 41: 1475-1479.
- ALBERTI KG., ZIMMET P., SHAW J. *Diabet Med* 2006; 23: 469-480.
- ASSMANN G., CULLEN P., ERBEY J., et al. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006; 16: 13-21.
- CARMENA R., DURIEZ P., FRUCHART J-C. *Circulation* 2004;109[suppl III]: III-2 -III-7.
- CRAIG WJ., MANGELS AR. *J Am Diet Assoc* 2009; 109: 1266-1282.
- FAREED D., IQBAL O., TOBU M., et al. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis* 2004; 10:357 - 364.
- GENSER B., SILBERNAGEL G., DE BACKER G., et al. *Eur Hearth J* 2012; 33: 444-451.
- GENSINI GG. *Am J Cardiol* 1983; 51: 606.
- GRANDGIRARD A., MARTINE L., DEMAISON L., et al. *Br J Nutr* 2004b; 91: 101-106.
- GRANDGIRARD A., MARTINE L., JOFFRE C., et al. *J Chromatogr A* 2004a; 1040: 239-250.
- GREENLAND P., SMITH SC., GRUNDY SM. *Circulation* 2001; 104: 1863-1867.
- HELSE S., MIETTINEN T., GYLLING H., et al. *J Lipid Res* 2008; 49: 1511-1518.
- HIDAKA H., NAKAMURA T., AOKI T., et al. *J Lipid Res* 1990; 31: 881-888.
- HOEFNER DM., HODEL SD., O'BRIEN JF., et al. *Clin Chem* 2001; 47: 266-274.
- HU C., VAN DER HEIJDEN R., WANG M., et al. *J Chrom B* 2009; 877: 2836-2846.
- CHASMAN DI., POSADA D., SUBRAHMANYAN L., et al. *JAMA* 2004; 291: 2821-2827.
- CHASMAN DI., PARE G., MORA S., et al. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000730. doi:10.1371/journal.pgen.1000730.
- JAKULJ L., MOHAMMED K., VAN DIJK TH., et al. *J. Lipid Res.* 2013. 54:1144–1150.
- JENKINS DJ., KENDALL WC., FAULKNER DA., et al. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62: 781-788.
- KOEIJOETS KC., VAN DER NET JB., DALLINGA-THIE GM., et al. *Atherosclerosis* 2009; 204: 453-458.
- LAI S-M., GRAY JI., ZABIK ME. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 1122-1126.
- LAMMERT F., MIQUEL J-F. *J Hepatol* 2008; 48: S124 - S135.
- LEA LJ., HEPBURN PA., WOLFREYS AM., et al. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 771-783.
- LAW M. *BMJ* 200; 320: 861-864.
- MANGRAVITE LM., KRAUSS RM. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18: 409-414.
- MIETTINEN TA., STRANDBERG TE., GYLLING H. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1340-1346.
- MIETTINEN TA., GYLLING H., LINDBOHM N., et al. *J Lab Clin Med* 2003; 141: 131-137.
- MIETTINEN TA., GYLLING H. *Atherosclerosis* 2002; 164: 147-152.
- NAITO Y., YOSHIDA H., NAGATA T., et al. *Toxicology* 2000; 146: 197-208.
- NATHAN NR., PENCINA M., LAROCQUE JM., et al. *J Lipid Res* 2009; 50: 1527-1535.
- O'CALLAGHAN YC., FOLEY DA., O'CONNELL MN., et al. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 10793e10798.
- O'CALLAGHAN Y., KENNY O., O'CONNELL NM., et al. *Biochimie* 2013; 95: 496e503.
- PLAT J., BRAGT MC., MENSINK RP. *J Lipid Res* 2005; 46: 68-75.
- PLAT J., BRZEZINKA H., LÜTJOHANN D., et al. *J Lipid Res* 2001; 42: 2030-2038.
- RYAN E., CHOPRA J., MCCARTHY FO., et al. *Br. J. Nutr.* 94 (2005) 443-451.
- SILBERNAGEL G., GENSER B., NESTEL P., MÄRZ W. *Curr Opin Lipidol* 2013a, 24:12–17.

SILBERNAGEL G., CHAPMAN MJ., GENSER B., et al. Am Coll Cardiol. 2013b; 62: 291-299.

STENDER S., FRIKKE-SCHMIDT R., NORDESGAARD BG., et al. Hepatology 2011; 53: 640-648.

SUDHOP T., GOTTWALD BM., VON BERGMANN K. Metabolism 2002; 51: 1519-1521.

SULLIVAN DR., MARWICK TH., FREEDMAN SB. Am Heart J 1990;119: 1262-1267.

TESLOVICH TM., MUSUNURU K., SMITH AV., et al. Nature 2010; 466: 707-713.

TEUPSER D., BABER R., CEGLAREK U., et al. Circ Cardiovasc Genet 2010; 3:331-339.

THEUWISSEN E. Disertační práce, Universitaire Ders Maastricht, Maastricht 2008.

THULUVA TS. Disertační práce, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn 2006.

TOMOYORI H., KAWATA Y., HIGUCHI T., et al. J Nutr 2004; 134: 1690-1696.

TVRZICKÁ E., VECKA M., STAŇKOVÁ B., ŽÁK A. Clin Chim Acta 2002; 465: 337-350.

VECKA M., ŽÁK A., TVRZICKÁ E. Čas Lék Česk 2007; 146: 337-342.

VECKA M., ŽÁK A., TVRZICKÁ E. Acta Univ Carol Med; Monographia CLIV, Praha 2008.

VISSERS MN., TRIP MD., HAYDN PRITCHARD P., et al. Eur J Clin Pharmacol 2008; 64: 651-661.

WEINGÄRTNER O., BÖHM M., LAUFS U. Eur Heart J 2009; 51: 1553-1561.

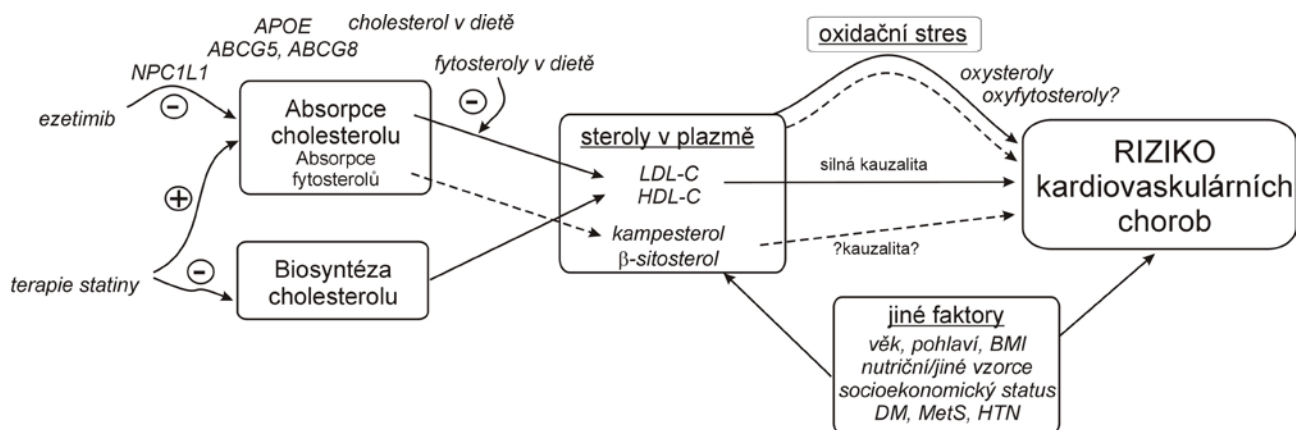
WEINGÄRTNER O., LÜTJOHANN D., JI S., et al. J Am Coll Cardiol 2008; 51: 1553-1561.

WEINGÄRTNER O., LÜTJOHANN D., BÖHM M., et al. Dtsch. Med. Wochenschr. 2011a; 136: 34-38.

WEINGÄRTNER O., LÜTJOHANN D., VANMIERLO T. Chem Phys Lipids 2011; 164: 451-456.

WELSH P., PACKARD CJ., SATTAR N. Curr Opin Clin Lipidol 2008; 19: 563-571.

Obr.1. Vztah fytoosterolů a kardiovaskulárních chorob



Nastavení homeostázy cholesterolu, důležitého patognomického faktoru kardiovaskulárních chorob, je závislé na hodnotách absorpce, biosyntézy a plazmatického poolu cholesterolu. Tyto parametry mohou být ovlivňovány fytoosteroly jak na úrovni absorpce, tak i vlastního metabolismu cholesterolu v těle. Zatímco vztah fytoosterolů a absorpce cholesterolu je předmětem podrobného výzkumu, další metabolismus a účinky fytoosterolů v lidském organismu nejsou známy (Genser 2012, Vecka 2008).

DIABETES MELLITUS 2. TYPU A JATERNÍ ONEMOCNĚNÍ - KLINICKÉ VZTAHY

M. Zeman, A. Žák, M. Vecka, T. Vařeka, J. Macášek

IV. interní klinika 1. LF UK a VFN Praha

Úvod

V současné době je na celém světě i v České republice zaznamenávána stále vzrůstající prevalence obesity a diabetes mellitus typu 2 (DM2), které jsou rizikovými faktory vzniku nejen kardiovaskulárních onemocnění, ale také některých nádorových i neurodegenerativních onemocnění. V posledních desetiletích paralelně s výskytem obezity a DM2 narůstá i výskyt nealkoholické jaterní steatozy (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*) (Collantes et al. 2004), která se stává nejčastějším jaterním onemocněním v rozvinutých zemích světa a dnes se předpokládá, že NAFLD stojí v pozadí řady případů tzv. kryptogenní cirhózy.

Obezita a DM2 jsou rizikovými faktory NAFLD. Nález NAFLD je na druhé straně spojen se zvýšeným rizikem DM2 a vzhledem k tomu, že NAFLD je vedle obezity významně asociována s inzulínovou rezistencí, hyperinzulinémií a aterogenní dyslipidémií, je dnes NAFLD řazena ke komponentám metabolického syndromu (Kotronen a Yki-Järvinen 2008).

Je zajímavé, že se zvýšeným rizikem DM2 je spojena nejen NAFLD, ale i jiná jaterní onemocnění, jako chronická virová hepatitis, hemochromatóza a jaterní cirhóza (Kawaguchi et al. 2011). Proto je v současné době vzájemný vztah mezi DM2 a jaterními onemocněními, zejména NAFLD předmětem intenzivního výzkumu.

Metabolismus glukózy v játrech a diabetes mellitus

Játra představují velký reservoár glukózy v těle a pomáhají udržovat stabilní hladinu glykémie. Játra podle potřeby organismu mohou glukózu utilizovat či uskladňovat nebo naopak produkovat. Zvýšený tok glukózy do jater vede ke zvýšené glykolýze a utilizaci glukózy v citrátovém cyklu po přeměně na pyruvát nebo ke zvýšené syntéze glykogenu. V těchto dějích hraje roli poměr mezi inzulínem a glukagonem určující rovnováhu mezi aktivací nebo inhibicí klíčových enzymů. Zvýšená hladina inzulínu a suprimovaná hladina glukagonu v prandiální fázi podporují utilizaci glukózy glykolýzou a syntézu glykogenu. Během lačnění, kdy je hladina inzulínu nízká, se zvyšuje hladina glukagonu; glukóza je odštěpována z glykogenu v procesu glykogenolýzy a také tvořena „*de novo*“ glukoneogenezou. Metabolismus glukózy v játrech úzce souvisí i s přeměnou tuků, což se může projevit i za patologických stavů. Zvýšená koncentrace mastných kyselin je spojena s inzulínovou rezistencí, např. vede k inhibici glukokinázy s poklesem vychytávání glukózy do hepatocytu a tím snížení syntézy glykogenu a následným zvýšením postprandiální glykémie. Nadbytek uhlovodanů ve stravě zase vede v hepatocytu k aktivaci lipogeneze „*de novo*“, se zvýšením syntézy nasycených mastných kyselin, ke zvýšené syntéze a hromadění triacylglycerolů (TAG) i diacylglycerolu (DAG) a vzniku steatózy jater. Jaterní inzulínová rezistence pak přispívá ke kompenzatorní hyperinzulinémii, která je často následována dysfunkcí pankreatických beta-buněk a rozvojem DM2.

Nealkoholická jaterní steatoza, nealkoholická steatohepatitis

Nealkoholická steatoza jater (NAFLD je onemocnění, charakterizované infiltrací jater tukem, hlavně ve formě TAG, kdy podíl tuku přesahuje 5 % váhy jater, přičemž není přítomna významná konzumace etylalkoholu (u mužů do 30 g a u žen do 20 g denně). Méně používaný český název této jednotky je nealkoholické ztukovatění jater. Prevalence NAFLD v posledních letech prudce stoupá, podobně jako prevalence obesity a diabetes mellitus

typu 2. Kolísá v běžné populaci mezi 20 – 30 % a patří k nejrozšířenějším jaterním onemocněním na celém světě. Pacienti s NAFLD jsou často symptomatictí a onemocnění je diagnostikováno náhodně. Podle Americké asociace pro studium jaterních nemocí AASLD (*American Association for the Study of Liver Diseases*) definice NAFLD vyžaduje a) průkaz jaterní steatozy buď zobrazovací metodou nebo histologicky a b) vyloučení sekundární příčiny akumulace tuku v játrech, jako např. vysoký přísun alkoholu, hladovění, parenterální výživa, steatogenní léky (např. kortikosteroidy, tamoxifen, amiodaron) či hereditární příčiny (Wilsonova choroba, abetalipoproteinémie) (Chalasani et al. 2012).

NAFLD podle histologického nálezu je možno dělit na NAFL (*non-alcoholic fatty liver*), kdy je přítomna jen steatoza jater bez průkazu hepatocelulární léze ve formě „balónování“ hepatocytů a NASH (*non-alcoholic steatohepatitis*), která je definována přítomností steatozy a zánětu, s poškozením hepatocytů („balónování“) s nálezem i bez nálezů fibrózy (Chalasani et al. 2012). NAFLD asi ve 20 % případů progreduje do NASH a ta zase asi ve 20 % do cirhózy. Je zajímavé, že u pacientů s NASH je riziko vzniku hepatocelulárního karcinomu (HCC) i bez přítomnosti cirhózy (Rahman a Ibdah 2012). Při histologickém vyšetření se u NAFLD nachází akumulace TAG v hepatocytech. Triacylglyceroly jsou tvořeny esterifikací FFA a glycerolu v hepatocyty. Volné mastné kyseliny pocházejí ze tří zdrojů: lipolýzy v tukové tkáni, z potravy a ze syntézy *de novo* v hepatocyty (lipogeneza *de novo*).

Obezita a inzulínová rezistence vede ke zvýšenému toku FFA z tukové tkáně do hepatocytů, zvyšuje se syntéza TAG a sekrece lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL). Výsledkem je hypertriacylglycerolémie (HTAG), zvýšená koncentrace apolipoproteinu B, pokles HDL-cholesterolu (HDL-C) a přítomnost malých, denzních LDL. Současný výskyt snížené koncentrace HDL-C, HTAG a malých denzních LDL se označuje pojmem aterogenní lipoproteinový fenotyp (ALP). Typická je dále zvýšená postprandiální lipémie. Tyto nálezy jsou běžné u metabolického syndromu i u DM2. Pokud je odsun FFA cestou sekrece VLDL nedostačující, zvyšuje se koncentrace FFA v hepatocytech, dochází k jejich zvýšené oxidaci a tvorbě ROS (*reactive oxygen species*) s následným poškozením hepatocytů. Byla formulována hypotéza „dvou zásahů“ („two-hit hypothesis“) při vzniku NASH. „Prvním zásahem“ je vznik prostého ztukovatění jater (NAFLD) například v důsledku přejídání a obezity, přičemž na rozvoji NASH se podílejí další faktory („second hit“), kterými může být oxidační stres, zánětlivá aktivace hvězdčkových buněk, zánětlivá reakce při syndromu bakteriálního přerůstání a další stavy (Dowman et al. 2010, Brůha et al. 2012). Hromadění tukových kapének v hepatocytech je důsledkem excesivního přísunu FFA, označovaný jako ektopické ukládání (*ectopic fatty acid storage*). Nadbytek FFA nebo jejich snížená oxidativní přeměna v buňkách mimo tukovou tkáň, jako jsou hepatocyty, ale také např. beta-buňky pankreasu či kardiomyocyty, vede k jejich chronické lézi a vzniku patologických stavů, jako je inzulínová rezistence, dysfunkce pankreatických beta-buněk, kardiomyopatie či steatohepatitis (Weinberg 2006). Zvýšený obsah TAG v hepatocyty může představovat mechanismus chránící hepatocyty před patogenním působením FFA. FFA působí v hepatocyty oxidační stres, spojený s aktivací zánětu a s apoptózou. Toxické působení FFA se projevuje na několika úrovních. Kyselina palmitová a stearová aktivují transkripční faktor FoxO3a (*Forkhead box O3*), s následnou indukcí proapoptotického faktoru *Bim*. Tyto mastné kyseliny aktivují také c-jun N-terminální kinázu (JNK), což vede k mitochondriální lézi indukované faktorem *Bax*, který navíc působí lysosomální lézi s proapoptotickým působením. Zvýšená oxidace mastných kyselin vede k tvorbě ROS, k oxidačnímu stresu a depleci antioxidantů. Palmitová a olejová kyselina aktivují *toll-like receptor 4* a indukují tak expresi prozánětlivých genů (Malhi a Gores 2008). Na lipotoxicitě se významným způsobem podílejí také ceramidy, což jsou komplexní lipidy složené ze sfingosinu a mastné kyseliny, obvykle palmitoyl CoA. Ke zvýšené tvorbě ceramidů v hepatocyty vede zvýšený přísun nasycených mastných kyselin, oxidační stres s deplecí antioxidantů a také zánět. Ceramidy aktivují

transkripční jaderný faktor NF- κ B, což pozitivní zpětnou vazbou amplifikuje zánětlivý proces. V hepatocytech ceramidy otupují inzulinem zprostředkovanou aktivaci *Akt* (serin/treoninová kináza, která je součástí signální dráhy inzulinu), která aktivuje anabolické procesy (např. syntézu glykogenu, bílkovin) a ovlivňuje příznivě buněčný růst a stabilitu (Pagadala et al. 2012). Patologické následky hromadění lipidů a jejich derivátů v játrech ústí v inzulinovou rezistenci je zřejmě hlavním činitelem patologických dějů, které spojují NAFLD, DM2 i zvýšené riziko manifestace KVO.

Nealkoholická steatoza jater, diabetes mellitus 2. typu a kardiovaskulární onemocnění

Pacienti s NAFLD mají výrazně vyšší riziko rozvoje DM2 ve srovnání s osobami bez NAFLD, nezávisle na věku, pohlaví či BMI (Kotronen a Yki-Järvinen 2008). Zvýšená hladina jaterních enzymů (GMT a ALT) předpovídá manifestaci DM2 nezávisle na BMI, spotřebě alkoholu či fyzické aktivitě (Fraser et al. 2009). U Indiánů kmene Pima zvýšená hladina ALT byla spojena s 2,3 násobným rizikem vzniku DM2 u osob s původně normální glukózovou tolerancí (Vojarova et al. 2002). Akumulace TAG a dalších lipidových molekul v játrech působí inzulinovou rezistencí, která se projevuje sníženou schopností inzulinu omezovat výdej glukózy z jater, což vede ke zvýšení glykémie, stimulaci inzulinové sekrece a hyperinzulinémii. Byla prokázána těsná korelace mezi obsahem tuku v játrech a hladinou inzulinu, nezávisle na obezitě (Kotronen et al. 2007). Hlavním zdrojem akumulace TAG v játrech je zvýšená lipolýza v tukové tkáni, s následným zvýšeným tokem FFA do jater. U osob s NAFLD má také význam lipogeneza v játrech *de novo*, která přispívá u zdravých osob jen asi 5 %, zatímco u pacientů s NAFLD až 30% (Yki-Järvinen 2010). Nemocní s NAFLD většinou splňují kritéria metabolického syndromu (viscerální obezita, aterogenní dyslipidémie, hypertenze, atd.), což jsou všechno rizikové faktory KVO (Kotronen a Yki-Järvinen 2008, Marchesini et al. 2003).

Nemocní s NAFLD mají vyšší incidenci KVO než osoby bez steatozy jater (Targher et al. 2007). V rozsáhlé studii sledující nemocné s DM2 byla u osob s NAFLD významně vyšší prevalence ICHS, cévního onemocnění mozku a ischemické choroby dolních končetin, nezávisle na tradičních rizikových faktorech, trvání diabetu, kompenzace diabetu, či užívání hypolipidemik, antihypertenziv a antidiabetik (Targher a Arcaro 2007). V kohortové studii u 2088 mužů byla ultrasonograficky diagnostikovaná NAFLD spojena se zvýšenou prevalencí ICHS (Lin et al. 2005). Ve skupině pacientů u kterých prováděna konsekutivně elektivní koronarografie, byla NAFLD korelovala s tíží nálezu nezávisle na klasických rizikových faktorech (Mirbagheri et al. 2007). Ve studii u diabetiků byla NAFLD stanovovaná magnetickou rezonanční spektroskopií, asociována s redukovanou myokardiální perfuzí, nezávisle na tradičních rizikových faktorech, objemem viscerálního tuku a inzulinové citlivosti (Lautamäki et al. 2006).

U pacientů s NAFLD pokročilost histologického nálezu a intenzita zánětu významně korelují se závažností aterogenní dyslipidémie a se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem (Alkhoury et al. 2009). V prospektivní studii bylo sledováno 420 pacientů po dobu průměrně 7,6 let a byla zjištěna vyšší celková mortalita u probandů s NASH nebo cirhózou (Adams et al. 2005), přičemž nejčastější příčinou smrti byla KVO nebo nádory. V jiné prospektivní, 28 let trvající studii, byla u nemocných s NASH ve srovnání s běžnou populací zjištěna vyšší mortalita na KVO a jaterní onemocnění i vyšší celková mortalita (Söderberg et al. 2010).

Možnosti léčebného ovlivnění nealkoholické steatózy

Základem příznivého ovlivnění NAFLD je změna životního stylu, zaměřená zejména na redukci nadměrné hmotnosti. Udává se, že pokles hmotnosti o 3 – 5 % upravuje steatozu, ale k úpravě zánětu je třeba pokles až o 10 % hmotnosti (Chalasanani et al. 2012). Vzhledem ke klíčové roli inzulinové rezistence v patogeneze NAFLD/NASH je další možností užití

farmak zvyšujících inzulínovou senzitivitu. Některé úspěchy byly dosaženy podáváním thiazolidinedionů. Hodnotí se zejména ústup nálezu „balónování“ jaterních buněk, lobulárního zánětu a omezení stupně fibrózy. Podávání pioglitazonu (45 mg/den) v randomizované kontrolované studii (RCT) u pacientů s NASH, kteří měli porušenou glukózovou toleranci nebo DM2 významně snížilo hladiny transamináz, „balooning“ hepatocytů a zánět; steatóza byla upravena u 73 % pacientů léčených pioglitazonem vs. 24 % u placebo (Belfort et al. 2006). V multicentrické RCT studii PIVENS (*Pioglitazone versus Vitamin E versus Placebo for the Treatment of Nondiabetic Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis*) u 247 ne-diabetiků byl podáván pioglitazon 30 mg; vitamin E 800 IU/den nebo placebo. Primárním cílem byla úprava NAS (NAFLD Activity Score) o ≥ 2 body, sekundárním cílem úprava histologického nálezu NASH. U nemocných užívajících pioglitazono dosaženo ústupu NASH v 47 % vs. s 21 % u placebo ($p = 0,001$) (Sanyal et al. 2010). Podle současného doporučení AASLD může být pioglitazon podáván u pacientů s biopticky potvrzenou NASH, s vědomím, že většina studií byla prováděna u nediabetiků, a že dlouhodobá účinnost a bezpečnost pioglitazonu nebyla ještě u nemocných s NASH definitivně potvrzena (Chalasan et al. 2012). Dalším potenciálně prospěšným lékem by mohl být metformin, u něhož však výsledky metaanalýz studií zatím nepotvrdily významný efekt na hladiny transamináz či na histologický nález ve srovnání s úpravou životního stylu, a proto podávání metforminu není v doporučeních pro léčbu NASH zahrnuto (Chalasan et al. 2012).

V experimentu i v klinických studiích byla zkoušena také nová antidiabetika: agonisté GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) a inhibitory dipeptidyl peptidázy 4 (DPP-4), gliptiny. Šestiměsíční podávání exenatidu nemocným s dobře kontrolovaným diabetem vedlo k asi 20 % redukci jaterní steatózy, kvantifikované magnetickou rezonanční spektroskopií (Orsi et al. 2009). Ústup NASH však prokázán nebyl (Kenny et al. 2010). Iwasaki et al. (2011) zkoušeli u 30 nemocných s DM2 a NAFLD sitagliptin a zaznamenali významné poklesy jaterních enzymů ALT, AST, GMT (sitagliptin je ovšem kontraindikován u těžké jaterní insuficience). V současné době však zatím ani agonisté GLP-1 ani gliptiny nejsou v léčbě NAFLD/NASH doporučeny. Vzhledem k významu abnormalit lipidového metabolismu v patogeneze NASH, jsou zkoušena i hypolipidemika, která jsou obvyklou součástí prostředků užívaných k intervenci komponent metabolického syndromu. Hraje zde roli také to, že nejčastější příčinou smrti nemocných s NAFLD/NASH jsou kardiovaskulární onemocnění (Misra et al. 2010). Statiny jsou běžně užívány v léčbě dyslipidémie, která NAFLD většinou provází. V řadě studií bylo zjištěno, že statiny jsou u nemocných s jaterním onemocněním bezpečné a nebylo prokázáno, že nemocní s NAFLD/NASH mají při léčbě statiny větší riziko jaterního poškození než osoby bez jaterního onemocnění (Chalasan et al. 2012). *Post hoc* analýza studie GREACE ukázala, že léčba statinem významně zlepšovala biochemické nálezy a snižovala výskyt kardiovaskulárních příhod u nemocných se zvýšenými hodnotami jaterních testů v důsledku NAFLD (Athys et al. 2010).

Zajímavou možností pro léčebné ovlivnění NAFLD/NASH je použití n-3 více-nenasycených mastných kyselin (PUFA n-3) vzhledem k širokému spektru příznivých účinků, mimo jiné ovlivnění inzulínové rezistence, snižování hladiny triacylglycerolů, účinku protizánětlivého a dalších (Žák et al. 2005). V současné době probíhá velká multicentrická studie v USA, analyzující možnost léčby NASH podáváním PUFA n-3. V doporučeních AASLD je zatím uvedeno, že PUFA n-3 mohou být zvažována jako lék první volby v léčbě hypertriacylglycerolémie u nemocných s NAFLD (Chalasan et al. 2012).

Pokročilé onemocnění jater a diabetes mellitus

Asociace pokročilého chronického jaterního onemocnění s poruchou metabolismu glukózy je známa již dlouhou dobu. U osob s jaterní cirhózou je až ve 30 % prokazován DM, přičemž poruchy glukózové tolerance byly popsány téměř u 96 % těchto nemocných

(Hickman a Macdonald 2007). U kompenzované jaterní cirhózy může být diabetes subklinický, lačná glykémie v mezích fyziologických, zvýšena je jen glykémie pozátěžová a porucha glukózové homeostázy je v těchto případech detekována při použití o-GTT (Nishida et al. 2006). Přítomna je periferní inzulínová rezistence, ale bývá i dysfunkce beta-buňky Langerhansových ostrůvků (Picardi et al. 2006). Příčiny inzulínové rezistence u chronického jaterního onemocnění, resp. cirhózy jater jsou komplexní, účastní se zde chronické působení zánětlivých cytokinů, jako je TNFalfa, interleukin 1 (IL-1) a IL-6, nebo alterace hormonální osy GH-IGF-1 (Picardi et al. 2006). Výsledky řady studií ukázaly, že inzulínová rezistence má u jaterní cirhózy původ částečně v adaptivních změnách splanchnické cirkulace, které vedou k periferní hyperinzulinémii při snížené clearanci inzulínu (Petrides a DeFronzo 1989). Výdej glukagonu je zvýšen. Hyperinzulinémie ale může být působena i jinými způsoby. U nemocných s jaterní cirhózou Child B by hyperinzulinémie mohla být spíše důsledkem zvýšené citlivosti pankreatických beta-buňek na glukózu než poruchou jaterní clearance inzulínu (Greco et al. 2002).

Případy diabetes mellitus, vnikající u nemocných s chronickým jaterním onemocněním, se označují jako hepatogenní diabetes (HD). Průběh onemocnění HD se liší od DM2 tím, že HD má menší riziko mikrovaskulárních i makrovaskulárních komplikací, což může být v souvislosti s kratším trváním diabetu, nižší hladinou cholesterolu, počtu krevních destiček aj. Naopak nemocní s HD častěji umírají na jaterní selhání (Moscatello et al. 2007). V prospektivní studii Nishidy et al. (2006) byl na začátku sledování u nemocných s jaterní cirhózou proveden o-GTT a bylo zjištěno, 38 % pacientů mělo DM, 23 % porušenou glukózovou toleranci (PGT) a 39 % mělo glukózovou toleranci normální. Po pětiletém sledování měli nemocní s DM, resp. PGT významně vyšší mortalitu (5 %, resp. 44 %, 32 %). Nezávislými prediktivními faktory délky přežití byly pouze hladina sérového albuminu a DM (Nishida et al. 2006). Hepatogenní diabetes je charakterizován nižší prevalencí DM2 v rodinné anamnéze, často je provázen epizodami hypoglykémie, a proto v souvislosti s relativně nízkým výskytem mikro- i makrovaskulárních komplikací se liší i léčebná doporučení. Vychází se z toho, že asi polovina nemocných s HD trpí malnutricí, v době diagnózy jsou často již v terminální fázi jaterního onemocnění, většina antidiabetik je metabolizována v játrech a nemocní s HD často trpí hypoglykémiami (Tolman et al. 2007). Proto není u cirhózy jater doporučována agresivní antidiabetická léčba.

Chronická virová hepatitida C a diabetes mellitus

Infekce virem hepatitidy C je spojena se zvýšeným rizikem DM2. V epidemiologických studiích bylo zjištěno, že u nemocných s chronickou infekcí virem hepatitidy C (HCV) je prevalence DM mezi 21 – 50 %, tedy významně vyšší (2 – 10 x) než u osob běžné populace, nebo u pacientů s jinými formami jaterního onemocnění (Negro a Alaei 2009). V jedné studii v USA u HCV-positivních nemocných bylo zjištěno trojnásobné riziko DM2 (Mehta et al. 2000). Mezi nemocnými s DM2 byla prevalence protilátek anti-HCV 4 – 28 % (Harrison 2006). Na druhé straně je u diabetiků 3 – 10 x vyšší riziko infekce HCV ve srovnání s různými kontrolními skupinami a 1,8 x vyšší riziko DM2 je u HCV pozitivních osob ve srovnání s osobami infikovanými virem hepatitidy B. Infekce HCV je také spojena se zvýšeným rizikem DM2 u pacientů po transplantaci jater nebo ledvin (Lonardo et al. 2009). U nemocných s HCV je zjišťována výrazná inzulínová rezistence (IR). Mechanismus, jakým zde IR vzniká, není jasný. Dosud provedené studie ukazují, že exprese jadrového proteinu HCV inzulínovou signalizaci v hepatocytu (Everhart 2001, Miyamoto et al. 2007). Pozátěžová IR je spojena s těžkou jaterní fibrózou jak u nemocných s chronickou virovou hepatitidou C, tak s NAFLD a pole některých autorů by její vyšetření mohlo identifikovat osoby s rizikem progresu onemocnění (Svegliati-Baroni et al. 2007). Steatóza může být pojítkem mezi HCV, DM a závažností onemocnění. Steatóza byla přítomna u 73 % pacientů

infikovaných virem hepatitidy C genotypu 3 a u 50 % infikovaných virem jiného genotypu (Asselah et al. 2006). Je zajímavé, že v nedávno provedené studii byla pozitivita HCV významně asociována s DM2 jen u osob bez hyperlipidémie (Liu et al. 2012). Zajímavé je, že infekce virem hepatitidy C má vztah k lipoproteinům. Navázání HCV na povrch hepatocytu vyžaduje vazbu na lipoprotein LDL, zprostředkovanou apolipoproteinem B nebo E. Lipoprotein HDL se zase účastní při vazbě HCV na scavengerové receptory SR-B1 na povrchu hepatocytu (Negro 2010). Klinicky významné je, že IR je spojena se špatnou odpovědí na antivirovou léčbu (Romero-Gomez et al. 2005). V současné době probíhají studie s cílem zjistit, zda podávání metforminu, který IR snižuje, nezlepší účinnost antivirové léčby u HCV.

Diabetes mellitus a hepatocelulární karcinom

Diabetes mellitus typu 2 je spojen s významně vyšším rizikem vzniku hepatocelulárního karcinomu (HCC) (Giovannucci et al. 2010). V rozsáhlé prospektivní kohortové studii byla přítomnost DM2 na začátku desetiletého sledování spojena s výrazně vyšší incidencí chronického onemocnění jater i HCC ve srovnání s osobami bez DM2, nezávisle na alkoholickém postižení jater či virové hepatitidě (El-Serag a Everhart 2002). Příčiny asociace DM2 a HCC nejsou objasněny, předpokládá se, že roli zde hrají zvýšené hladiny inzulínu a růstového faktoru IGF (insulin-like growth factor) a inzulínová rezistence podobně jako u některých jiných nádorů (Hung et al. 2010, Giovannucci et al. 2010). Přítomnost virové hepatitidy C, jaterní fibrozy a požívání alkoholu riziko dále zvyšuje. Podávání metforminu nemocným s DM2 významně snižuje riziko vzniku HCC. V rozsáhlé metaanalýze několika studií byla léčba metforminem spojena asi s 62 % poklesem rizika HCC u nemocných s DM 2 (Zhang et al. 2012).

Transplantace jater a diabetes mellitus

Asi u 16 % pacientů, podstupujících transplantaci jater, je přítomen diabetes mellitus (Yoo a Thuluvath 2002). Preexistující DM ovlivňuje prognózu transplantace, takže pětileté přežití pacienta i štěpu je významně kratší u diabetiků ve srovnání s nediabetiky a u diabetiků 1. typu kratší než u diabetiků 2. typu (John a Thuluvath 2001). Diabetes mellitus se může také manifestovat jako důsledek transplantace a také v těchto případech negativně ovlivňuje morbiditu i mortalitu těchto nemocných. Rizikové faktory vzniku posttransplantačního diabetu jsou infekce cytomegalickým virem (která může poškodit sekreci inzulínu), HCV infekce (která působí inzulínovou rezistenci a může také poškozovat beta buňky pankreasu). Léčba interferonem v pretransplantační fázi snižovala riziko posttransplantačního DM u nemocných s HCV (Phuong et al. 2007). K dalším rizikovým faktorům vzniku posttransplantačního diabetu patří léčba kortikosteroidy a inhibitory calcineurinu (cyklosporin a zejména tacrolimus) (Gomes a Cobas 2009). Po transplantaci má 15 – 40 % příjemců zvýšenou hladinu plasmatického cholesterolu a asi 40 % má hypertriacylglycerolémii. V terapii je proto důležitá vhodná úprava diety, cvičení a podávání statinů.

V nedávno publikované velké retrospektivní kohortové studii v USA bylo zjištěno, že diabetes je významným rizikovým faktorem nejen pro rozvoj KVO, ale také postupující renální insuficienci a infekci. Diabetes byl v jedné studii také spojen s rekurentní hepatitis C po transplantaci a s akcelerovanou fibrózou a cirhózou (Parekh et al. 2012). V této studii každý rok trvání diabetu významně zvyšoval celkovou mortalitu, i mortalitu na KVO, infekci či selhání štěpu, přičemž nebyly zjištěny tyto vztahy pro trvání hypertenze či hyperlipidémie. Ukazuje to na význam pečlivého sledování a léčby diabetu. V malé studii transplantace jater vedla k ústupu hepatogenního diabetu u 2/3 pacientů s cirhózou jater (Perseghin et al. 2000).

Závěry

Závěrem je možno konstatovat, že je nepochybně prokázána významná a nepříznivá asociace mezi diabetes mellitus 2. typu a jaterními onemocněními, zejména NAFLD. Prevalence NAFLD v současné době stále stoupá, stejně jako prevalence diabetes mellitus typu 2. a obesity. Vztah mezi diabetes mellitus typu 2 a NAFLD je zřejmě obousměrný.

NAFLD je rizikovým faktorem KVO, nezávisle na přítomnosti DM2, přičemž progresse prosté steatozy do NASH toto riziko zvyšuje. Dosud není spolehlivě vyřešeno, jaké faktory mezi nemocnými s NAFLD vedou k rozvoji KVO u většiny pacientů a co vede u části nemocných k vývoji cirhózy. Objasnění těchto otázek by mohlo zlepšit možnosti léčebných strategií i objasnit prediktivní význam různých klinických, biochemických a dalších markerů. Jednoznačné doporučení pro léčebné ovlivnění NAFLD není zatím, bohužel, k dispozici.

Práce byla podpořena výzkumnými projekty: (1) RVO-VFN 641265/2012 Ministerstva zdravotnictví České republiky; (2) PRVOUK-P25/LF1/2 Karlovy Univerzity v Praze

Literatura

- ADAMS LA., LYMP JF., ST SAUVER J., et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129: 113-121.
- ALKHOURI N., TAMIMI TA., YERIAN L., et al. The inflamed liver and atherosclerosis: a link between histologic severity of nonalcoholic fatty liver disease and increased cardiovascular risk. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2644-2650.
- ASSELAH T., RUBBIA-BRANDT L., MARCELLIN P., NEGRO F. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut* 2006; 55: 123-130.
- ATHYROS VG., TZIOMALOS K., GOSSIOS TD., et al., for the GREACE Study Collaborative Group. *Lancet* 2010; 376: 1916-1922.
- BELFORT R., HARRISON SA., BROWN K., et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2006; 355: 2297-2307.
- BRŮHA R., DVOŘÁK K., PETRTÝL J. Onemocnění jater u diabetiků, *Vnitř Lék* 2013; 59: 546-550.
- COLLANTES R., ONG JP., YOUNOSSI ZM. Nonalcoholic fatty liver disease and the epidemic of obesity. *Cleveland Clin J Med* 2004; 71: 657-664.
- DOWMAN JK., TOMLINSON JW., NEWSOME PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM* 2010; 103: 71-83.
- EL-SERAG HB., EVERHART JE. Diabetes increases the risk of acute hepatic failure. *Gastroenterology* 2002; 122: 1822-1828.
- EVERHART J. A confluence of epidemics: does hepatitis C cause type 2 diabetes? *Hepatology* 2001; 33: 762-763.
- FRASER A., HARRIS R., SATTAR N., et al. Alanine aminotransferase, gamma-glutamyltransferase, and incident diabetes: the British Women's Heart and Health Study and meta-analysis. *Diabetes Care* 2009; 32: 741-750.
- GIOVANNUCCI E., HARLAN DM., ARCHER MC., et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* 2010; 33: 1674-1685.
- GOMES MB., COBAS RA. Post-transplant diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2009; 1: 14.
- GRECO AV., MINGRONE G., MARI A., et al. Mechanisms of hyperinsulinaemia in Child's disease grade B liver cirrhosis investigated in free living conditions. *Gut* 2002; 51: 870-875.
- HARRISON SA. Liver disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 68-76
- HICKMAN IJ., MACDONALD GA. Impact of diabetes on the severity of liver disease. *Am J Med* 2007; 120: 829-834.

- HUNG CH., WANG JH., HU TH., et al. Insulin resistance is associated with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2265-2271.
- CHALASANI N., YOUNOSSI Z., LAVINE JE., et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55: 2005-2023.
- IWASAKI T., YONEDA M., INAMORI M., et al. Sitagliptin as a novel treatment agent for non-alcoholic Fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 2103-2105.
- JOHN PR., THULUVATH PJ. Outcome of liver transplantation in patients with diabetes mellitus: a case-control study. *Hepatology* 2001; 34: 889-895.
- KAWAGUCHI T., TANIGUCHI E., ITOU M., et al. M. Insulin resistance and chronic liver disease. *World J Hepatol* 2011; 3: 99-107.
- KENNY PR., BRADY DE., TORRES DM., et al. Exenatide in the treatment of diabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis: A case series. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 2707-2709.
- KOTRONEN A., WESTERBACKA J., BERGHOLM R., et al. Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3490-3497.
- KOTRONEN A., YKI-JÄRVINEN H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 27-38.
- LAUTAMÄKI R., BORRA R., IOZZO P., et al. Liver steatosis coexists with myocardial insulin resistance and coronary dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E282-E290.
- LEANDRO G., MANGIA A., HUI J., et al. Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic Hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology* 2006; 130: 1346-1362.
- LIN YC., LO HM., CHEN JD. Sonographic fatty liver, overweight and ischemic heart disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4838-4842.
- LIU JL., CHEN JY., CHEN CT., et al. Community-based cross-sectional study: the association of lipids with hepatitis C seropositivity and diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1688-1694.
- LONARDO A., ADINOLFI LE., PETTA S., et al. Hepatitis C and diabetes: the inevitable coincidence? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 293-308.
- MALHI H., GORES GJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 360-369.
- MARCHESINI G., BUGIANESI E., FORLANI G., et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917-923.
- MEHTA SH., BRANCATI FL., SULKOWSKI MS., et al. Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med* 2000; 133: 592-599.
- MIRBAGHERI SA., RASHIDI A., ABDI S., et al. Liver: an alarm for the heart? *Liver Int* 2007; 27: 891-894.
- MISRA VL., KHASHAB M., CHALASANI N. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Curr Gastroenterol Rep* 2009; 11: 50-55.
- MIYAMOTO H., MORIISHI K., MORIYA K., et al. Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2007; 81: 1727-1735.
- MOSCATELLO S., MANINI R., MARCHESINI G. Diabetes and liver disease: an ominous association. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17: 63-70.
- NEGRO F., ALAEI M. Hepatitis C virus and type 2 diabetes. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1537-1547.
- NEGRO F. Abnormalities of lipid metabolism in hepatitis C virus infection. *Gut* 2010; 59: 1279-1287.

- NISHIDA T., TSUJI S., TSUJI M., et al. Oral glucose tolerance test predicts prognosis of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 70-75.
- ORSI C., MATTHEW M., CHEN J., et al. Adding exenatide to bedtime insulin detemir promotes weight loss and improves hepatic steatosis in insulin-treated patients with T2DM. *Diabetologia* 2009; 52(Suppl. 1): A248.
- PAGADALA M., KASUMOV T., MCCULLOUGH AJ., et al. Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 365-3671.
- PAREKH J., CORLEY DA., FENG S. Diabetes, Hypertension and Hyperlipidemia: Prevalence Over Time and Impact on Long-Term Survival After Liver Transplantation. *Am J Transplant* 2012; 12: 2181-2187.
- PERSEGHIN G., MAZZAFERRO V., SERENI LP., et al. Contribution of reduced insulin sensitivity and secretion to the pathogenesis of hepatogenous diabetes: effect of liver transplantation. *Hepatology* 2000; 31: 694-703
- PETRIDES AS., DE FRONZO RA. Glucose and insulin metabolism in cirrhosis. *J Hepatol* 1989; 8: 107-114.
- PHUONG PT., PHUONG-CHI PT., LIPSHUTZ GS., WILKINSON AH. New onset diabetes mellitus after solid organ transplantation. *Endocrinol Metabol Clin NA* 2007; 36: 873-890.
- PICARDI A., D'AVOLA D., GENTILUCCI UV., et al. Diabetes in chronic liver disease: from old concepts to new evidence. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 274-283.
- RAHMAN RN., IBDAAH JA. Nonalcoholic fatty liver disease without cirrhosis is an emergent and independent risk factor of hepatocellular carcinoma: a population based study. *Hepatology* 2012; 56: 241A.
- ROMERO-GOMEZ M., DEL MAR VILORIA M., ANDRADE RJ., et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2005; 128: 636-641.
- SANYAL AJ., CHALASANI N., KOWDLEY KV., et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010; 362: 1675-1685.
- SÖDERBERG C., STÅL P., ASKLING J., et al. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology* 2010; 51: 595-602.
- SVEGLIATI-BARONI G., BUGIANESI E., BOUSERHAL T., et al. Post-load insulin resistance is an independent predictor of hepatic fibrosis in virus C chronic hepatitis and in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2007; 56: 1296-1301.
- TARGHER G., ARCARO G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007; 191: 235-240.
- TARGHER G., BERTOLINI L., PADOVANI R., et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 1212-1218.
- TOLMAN KG., FONSECA V., DALPIAZ A., TAN MH. Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. *Diabetes Care* 2007; 30: 734-743. VOZAROVA B., STEFAN N., LINDSAY RS., et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 1889-1895.
- WEINBERG JM. Lipotoxicity. *Kidney Int* 2006; 70: 1560-1566.
- YKI-JÄRVINEN H. Liver fat in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Dig Dis* 2010; 28: 203-209.
- YOO HY., THULUVATH PJ. The effect of insulin-dependent diabetes mellitus on outcome of liver transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 1007-1012.
- ZHANG ZJ., ZHENG ZJ., SHI R., et al. Metformin for liver cancer prevention in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 2347-2353.
- ŽÁK A., TVRZICKÁ E., ZEMAN M., VECKA M. Patofyziologie a klinický význam vícenenasycených mastných kyselin řady n-3. *Čas Lék čes* 2005; 144(Suppl. 1): 6-18.

XANTOMY - KLINICKÉ A PATOFYZIOLOGICKÉ VZTAHY

A. Žák, M. Zeman, A. Slabý, M. Vecka

IV. interní klinika I. LF UK a VFN v Praze

Souhrn

Xantomy jsou shluky pěnových buněk lokalizované v pojivové tkáni. Vznikají transformací makrofágů v důsledku vychytávání oxidativně modifikovaných LDL (ox-LDL) prostřednictvím specifických receptorů nebo fagocytózou (agregáty LDL, komplexy LDL s protilátkami). Eruptivní xantomy jsou kožní manifestací těžké hypertriglyceridémie a signalizují riziko akutní pankreatitidy a manifestace diabetes mellitus. Xanthoma striatum palmare je patognomickým projevem primární dys- β -lipoproteinémie.

Vznik xantomů je podobný vývoji časného stádia aterosklerotické léze. V obou případech má rozhodující význam několik patofyziologických dějů: (i) zachycení a průnik monocytů do cévní stěny; (ii) přestup LDL do extravaskulárního prostoru a jeho oxidativní modifikace (ox-LDL); (iii) akumulace ox-LDL makrofágy a jejich transformace na pěnové buňky; (iv) odsun nadbytečného cholesterolu z makrofágů/pěnové buňky pomocí reverzního transportu cholesterolu (RCT); (v) další faktory [především zvýšená permeabilita, intenzita zánětu na stimulaci (ox-LDL)].

Šlachové a tuberózní xantomy jsou specifické familiární autozomálně dominantní hypercholesterolemie [familiární hypercholesterolemii (FH), na podkladě mutací *LDLR*, familiární defekt apolipoproteinu B 100 (FDB) v důsledku mutace *APOB* a non-FH/non-FDB hypercholesterolemii (FH3) s mutacemi v genu *PCSK9*]. Šlachové a tuberózní xantomy jsou specifické pro vzácné jednotky jako je cerebrotendinózní xantomatóza (CTX) na podkladě mutace *CYP27A* a familiární β -sitosterolemie s mutacemi *ABCG5/G8*. Zvýšené koncentrace LDL-cholesterolu, resp. fytoosterolů (u sitosterolemie) a cholestanolu (u CTX) a jejich ukládáním v tkáních je spojeno s rozvojem xantomů, ateromatózních plátů a předčasnou aterosklerózou. Xanthelasma palpebrarum (XP) donedávna považované za benigní projev kosmetického charakteru, zkracuje průměrnou délku života o 15 let a zvyšuje riziko KVO o více než 40 % po adjustaci na klinicky významné kovariáty. U pacientů s FH v důsledku mutací genu *LDLR* nemocní s šlachovými xantomy (TX, tendon xanthoma) měli 2 - 4 krát vyšší riziko KVO ve srovnání s jedinci s FH bez TX. Difúzní plošné xantomy jsou často asociovány s paraproteinémií a nádorovými lymfoproliferativními onemocněními.

Klíčová slova: xantomy, dyslipidémie, oxidativní modifikace LDL, pěnové buňky, zánět, kardiovaskulární riziko

Úvod

Definice. Xantomy jsou shluky pěnových buněk lokalizované v pojivové tkáni kůže, šlach, fascií a periostu. Pěnové buňky vznikají v důsledku postupné akumulace lipidů v makrofázích mechanismem vychytávání lipoproteinů prostřednictvím specifických receptorů nebo fagocytózou (Toth 2007, Brewer 2009, Koumar 2010). Klinicky se xantomy manifestují jako měkké až polotuhé makuly (či plochy), papuly a uzly, nažloutlé barvy (*řecky xanthos žlutý, oma tumor, elasma destička*), která je podmíněna přítomností karotenu v lipidech pěnových buněk (Török 1998).

Klinický význam. Xantomy zahrnují širokou škálu kožních útvarů, od plochých xantomů, přes šlachové xantomy až po nejvíce prevalentní xanthelasma palpebrarum. Xantomy mohou být na straně jedné pouze benigním kosmetickým projevem, na straně druhé mohou

signalizovat závažné metabolické (dyslipidémie, diabetes mellitus) nebo nádorové (nejčastěji lymfoproliferativní) zdraví i život ohrožující onemocnění.

Eruptivní xantomy jsou kožní manifestací těžké hypertriglyceridémie (HTG) a signalizují riziko akutní pankreatitidy a diabetes mellitus (DM) (Richter 1992, Renner et al. 2008). Xantomy v palmárních rýhách (*xanthoma striatum palmare*) jsou patognomickým kožním projevem primární dys- β -lipoproteinémie (*synonymum* hyperlipoproteinémie III. typu, broad beta disease) (Durrington a Sniderman 2000, Spanou a Borradori 2010). Šlachové a tuberózní xantomy jsou specifické pro familiární hypercholesterolémii (FH), působenou mutacemi v genu LDL-receptoru (*LDLR*), familiární defekt apolipoproteinu B 100 (FDB) podmíněný mutací *APOB* a non-FH/non-FDB hypercholesterolémii (FH3) s mutacemi v genu *PCSK9*. Šlachové a tuberózní xantomy jsou specifické také pro vzácné jednotky jako je cerebrotendinózní xantomatóza (CTX) vznikající na podkladě defektu genu 27-sterolové hydroxylázy (*CYP27A*) a familiární β -sitosterolémie (*synonymum* fytosterolémie) s mutacemi genu kódující specifické transportéry *ABCG5* a *ABCG8*, které jsou odpovědné za sekreci sterolů [cholesterolu i fytosterolů (β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol, brasikasterol)] z enterocytů do střevního lumina a z hepatocytu do žluči. (Alam 2000, Singh a Simalti 2009, Clayton 2011, Kalidaz a Behrouz 2008, Cheby et al. 2003). Uvedené poruchy lipidového metabolismu jsou charakterizovány zvýšenými koncentracemi LDL-cholesterolu, případně fytosterolů (u sitosterolémie) a cholestanolu (u CTX) a spojeny s jejich zvýšeným ukládáním v tkáních, což se projevuje zejména rozvojem xantomů, ateromatózních plátů v cévách a s tím související předčasnou klinickou manifestací aterosklerózy.

Šlachové xantomy mohou být negativně vnímány z estetického hlediska, dále mohou zvl. v oblasti Achillovy šlachy působit bolesti (achillodynie) a zapříčinit i spontánní rupturu šlachy (Tsouli et al. 2005).

Xantelasma víček (XP, *xanthelasma palpebrarum*) je nejčastější nejvíce prevalentní formou xantomů. Až donedávna bylo XP považováno za benigní projev kosmetického charakteru (Christoffersen et al. 2011). Italská prospektivní studie prokázala, že přítomnost XP výrazně ovlivňuje délku života u mužů středního věku. Jejich nálezy, podobně jako dalších faktorů, vesměs definovaných jako kardiovaskulární rizikové faktory, zkracoval průměrnou délku života v o 15 let (Menotti et al. 2013). Předpokládá se, že nositelé XP mají zhruba v 50 (v rozsahu 20 - 70) % DLP (Bergman 1998, Crook 2008). Dánská prospektivní studie (The Copenhagen City Heart Study) u téměř 13 tisíc sledovaných osob po dobu delší 20 let prokázala, že přítomnost XP zvyšuje u nositelů riziko infarktu myokardu (IM) o 48 %, ICHS o 38 % a ischemické choroby dolních končetin (ICHDK) o 70 %. Tyto změny byly průkazné i po adjustaci na věk, pohlaví, BMI, DM, kouření, hypolipidemickou léčbu i postmenopauzální status (Christoffersen et al. 2011). Jiná studie doložila u osob s XP vyšší prevalenci nealkoholické steatózy jater (NAFLD) a vyšší hodnoty tloušťky komplexu intima-media společné karotidy (CIMT) (Sandhi 2012).

Šlachové xantomy a aterosklerotické pláty mají podobné složení (akumulace transformovaných monocytů/makrofágů a jejich přeměna na pěnové buňky se zánětlivou reakcí v okolí) a také pravděpodobně stejné mechanismy akumulace lipoproteinů (Tsouli et al. 2009). Ve skupině pacientů s geneticky prokázanou FH v důsledku mutací genu *LDLR* nemocní s přítomnými šlachovými xantomy (TX, tendon xanthoma) měli 3,3-krát vyšší riziko kardiovaskulárních onemocnění (KVO) ve srovnání s jedinci bez TX (Oosterveer et al. 2009). Podobně, nezávisle na mutaci *LDLR*, bylo zjištěno zvýšené riziko ICHS (2,3-krát) jak u mužů, tak i u žen (4,5-krát) s geneticky prokázanou FH u jedinců klinicky manifestními TX (Civeira et al. 2005).

Některé formy difúzních plošných xantomů jsou asociovány s paraproteinémií [mnohočetný myelom (MM), monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)] a nádorovými lymfoproliferativními onemocněními [kožní lymfomy, chronická lymfatická

leukémie CLL), chronická myeloidní leukémie (CML)] (Spanou a Borradori 2010, Szalat et al. 2011).

Klasifikace a rozdělení

Xantomy je možné klasifikovat z několika hledisek. Existuje klasifikace patologicko-anatomická, klasifikace z pohledu vnitřního lékařství (resp. lipidologie, či hematologie) klasifikace morfologická i rozdělení z pohledu kožního lékařství.

Například Szalat a spol. (2011) rozděluje xantomy na normolipidemické (NX), hyperlipidemické (HX) a nekrobiotický xantogranulom (NXG) (Jeziorska et al. 2003, Szalat et al. 2011). Z klinicko-patologického hlediska vytvářejí NX plochá a difusní ložiska, naproti tomu HX jsou polymorfni; častěji se manifestují jako xantomy tuberózní, šlachové, palmární a eruptivní. Nekrobiotický xantogranulom vytváří mnohočetná nažloutlá (někdy modrofialová až hnědočervená) papulo-nodulární depozita (či plochá ložiska) lokalizovaná především periorbitálně, se sklonem k ulceracím. Histologickým substrátem NX a HX jsou pěnové buňky lokalizované v kůži (resp. podkoží) a tkáni šlach a periostu. Naproti tomu NXG je asociován s nekrobiózou, jeho podkladem jsou vedle pěnových buněk také gigantické mnohjaderné Toutonovy buňky a kolagenní nekróza (Török 1998, Szalat et al. 2011). Normolipidemické xantomy a NXG jsou často spojeny s monoklonální gamapatií a lymfoproliferativními nádorovými chorobami (MM, MGUS, MDS, NHL, Waldenströмова choroba) (Szalat et al. 2011).

Z klinického hlediska rozdělujeme xantomy na (i) papulo-nodulární a (ii) plošné xantomy. Do první skupině se řadí *xanthoma eruptivum*, *xanthoma tuberosum*, *xanthoma tendineum et articulare*. Do druhé skupiny patří *xanthoma diffusum planum*, *xanthoma intertriginosum*, *xanthoma striatum palmare* (resp. *xantochromia striatum palmaris*), *xanthelasma palpebrarum* a vzácné *xanthoma disseminatum* (Štork 2008).

Etiologie a patogeneze

Histologickým podkladem xantomů jsou pěnové buňky, které vznikají transformací z monocytů a makrofágů; charakteru pěnových buněk nabývají zvýšeným obsahem lipidů, které se akumulují intracelulárně vychytáváním LP z extracelulárního prostoru pomocí specifických receptorů nebo fagocytózou agregátů, které vytvářejí LP spolu s gama-globuliny nebo specifickými protilátkami.

Z chemického hlediska obsahují především cholesterol. Šlachové xantomy sestávají převážně z lipidů (33 %) a z kolagenu (24 %), přičemž převažující frakcí lipidů je neesterifikovaný cholesterol (55 %), estery cholesterolu (28 %) a fosfolipidy (13 %) (Tsouli et al. 2005).

Z formálně-patologického hlediska se předpokládá zvýšená extravasace LP cévní stěnou do tkání, kde jsou vychytávány monocyty a makrofágy, které se mění v pěnové buňky. V celém procesu se uplatňuje (i) zvýšená koncentrace lipidů, resp. LP; (ii) přítomnost kvalitativně odlišných LP při normálních koncentracích lipidů; (iii) porucha reverzního transportu cholesterolu (RCT); (iv) lokální poruchy vedoucí ke zvýšení extravasace LP (jako je zvýšená permeabilita, zvýšení místní cirkulace, či zánět); (v) genetické faktory řídící intenzitu zánětu na podnět; (vi) syntéza lipidů *in situ* s jejich ukládáním do histiocytů; (vii) kombinace faktorů (Zeman et al. 1981, Štork 2008).

Vznik a vývoj xantomů je podobný vývoji časného stádia aterosklerotické léze. V obou případech mají rozhodující význam tři patofyziologické děje: (i) zachycení a průnik monocytů do cévní stěny; (ii) vstup LP, zejména lipoproteinu o nízké hustotě (LDL, low density lipoprotein) a jeho oxidativní modifikace; (iii) odsun nadbytečného cholesterolu z makrofágů, resp. pěnové buňky.

Bylo prokázáno, že nativní, chemicky nemodifikované LDL nejsou schopny indukovat vznik pěnové buňky, protože katabolismus LDL cestou specifických LDL-R (apoB/E receptor) probíhá pomalu a vstup LDL do buňky a intracelulární homeostáza cholesterolu je *těsně a* efektivně regulována. Vstup nativní (chemicky nemodifikované) částice LDL do buňky je následován rozštěpení esterů cholesterolu na volný (neesterifikovaný) cholesterol a mastnou kyselinu. Volný cholesterol inhibuje syntézu cholesterolu *de novo*, inhibuje syntézu LDL-R a aktivuje esterifikaci volného cholesterolu na jeho estery.

Chemická modifikace [acetylací, oxidativní působením malondialdehydu (MDA) či 9-hydroxynonenalu (9-HNE)] mění lipidovou i proteinovou složku LDL; změna struktury LDL vede ke ztrátě afinity ke LDL-R a zvyšuje afinitu částice k „zametacím“ (scavenger) receptorům (SR, scavenger receptor). Katabolismus oxidativně modifikovaných LDL (ox-LDL) zametacími receptory je rychlý. Cholesterol vycíhaný přes zametací receptory [SR, (scavenger receptor) SR-A, SR-B1, CD36 a další jako je lektin-like OxLDL receptor1 (LOX-1)] neaktivuje zpětnovazebnou regulaci intracelulární syntézy cholesterolu a rychle se proto zvyšuje jeho obsah v buňce. Buňka je schopna udržet homeostázu cholesterolu pouze jeho vyloučením s pomocí zpětného (reverzního) transportu cholesterolu (RCT, reverse cholesterol transport), který prostřednictvím HDL zajišťuje přesun cholesterolu z periferních tkání do jater (Miller a Tsimikas 2009).

Na oxidativní modifikaci LDL se podílejí neenzymatické systémy (ionty Cu^{2+} , Fe^{3+} , z hemu a protoporfyrinu IX) i enzymatické systémy (myeloperoxidáza, lipoxygenázy, NADPH oxidázy) obsažené v buňkách endotelu, monocytech a makrofázích, fibroblastech (Miller a Tsimikas 2009). Zachycení monocytů ovlivňují cytokiny jako je MCP-1 (monocyte chemotacting protein-1) interleukiny (IL)-1, IL-8 a TNF- α . Působením oxidační modifikace vznikají nejprve minimálně modifikované LDL (mm-LDL), u kterých je oxidativně změněna pouze jejich lipidové složka (vznik konjugovaných dienů, aldehydů) a následně oxidativně modifikované LDL (ox-LDL), které obsahují oxidačně modifikované lipidy i apolipoproteiny (apo). Působením mm-LDL je indukována syntéza faktoru stimulující kolonie monocytů (M-CSF), který podporuje proliferaci monocytů a jejich diferenciaci v makrofágy. Po průniku LDL a jejich transformaci na mm-LDL sekvestrují LDL po vazbě na glykosaminoglykany a jsou dále oxidovány na ox-LDL. Makrofágy vychytávají agregované LDL (i s gamaglobuliny) přes Fc-receptor či komplexy protilátek s ox-LDL. S postupujícím vychytáváním ox-LDL se makrofágy přeměňují na pěnové buňky, které již nejsou schopny vycestovat z místa aterosklerotické léze či tumorózní masy xantomu.

Reverzní transport cholesterolu je složitý a dynamický proces, kterým je přenášen cholesterol z periferních tkání zpět do jater. Celý proces zahrnuje sled několika kroků (i) přenos cholesterolu z intracelulárního prostoru k buněčné membráně, (ii) externalizaci (efflux) cholesterolu řadou mechanismů [prostá difúze, přenos pomocí specifických transportních proteinů (ABCA1, ABCG1, ABCG4), transport pomocí SR B-1] (iii), esterifikace cholesterolu působením enzymu lecithin:cholesterol acyltransferasy (LCAT) na estery cholesterolu (CE), který je spojen se vznikem sférických HDL; (iv) přenos CE z HDL na LP částice s nižší hustotou, nesoucí apoB (VLDL, IDL a LDL) působením transferového proteinu pro CE (cholesteryl ester transfer protein, CETP); (v) posledním krokem je vychytávání všech LP částic nesoucích CE specifickými receptory v játrech (SR B1- pro HDL, LRP pro IDL, β -VLDL a velké HDL, LDL-receptor pro IDL a LDL).

Limitujícím krokem celého procesu je přenos cholesterolu z buněčné membrány pomocí specifických transportérů (ABCA1, ABCG1, ABCG4) na HDL. Mutace v genu pro transportér ABCA1 je vzácná a účinnost (resp. rychlost) RCT je limitována u osob s nízkou koncentrací HDL, tudíž nízkou dostupností akceptoru pro nadbytečný cholesterol. Je známo, že akceptorem cholesterolu přenášených pomocí ABCA1 je subfrakce HDL, označovaná jako pre- β -HDL1, která je obsahuje pouze apoA-I a fosfolipidy (PL) (LpA-I),

zatímco částice HDL₃ se uplatňují jako akceptory při transportu cholesterolu pasivní difusí a pomocí transportérů ABCG1 a ABCG4. Alternativní je také RCT mezi tkáněmi vybavenými SR B-1 (játra, makrofágy/pěnové buňky) prostřednictvím HDL₂, která spočívá v selektivním předávání cholesterolu (především jeho esterů) mezi periferními tkáněmi [makrofágy/pěnové buňky (ateroklerotických lézí, xantomů)], játry (jako centrálním orgánem eliminace cholesterolu) a specifickými tkáněmi steroidního metabolismu s vysokými nároky na potřebu cholesterolu (nadledviny, játra, testes, ovaria) (Brewer 2009, Toth 2007).

Hypotézu o vztahu mezi oxidativní modifikací lipoproteinů, reverzním transportem cholesterolu a rozvojem xantomatózních lézí podporují výsledky řady klinických studií. U nemocných s FH korelovala velikost xantomů Achillovy šlachy pozitivně s titrem protilátek proti ox-LDL a průměrnou roční koncentrací cholesterolu. Velikost šlachových xantomů negativně korelovala s koncentrací subfrakce HDL₃ (Tsouli et al. 2005). U osob s FH byl výskyt šlachových xantomů významně asociován s věkem, pohlavím, koncentrací LDL-cholesterolu a hypertenzí (Civeira et al. 2005). Pacienti s XP měli vyšší koncentrace celkového cholesterolu (TC, total cholesterol), LDL-C, apoB a TG a nižší koncentrace HDL-C a apoA-I (Christoffersen et al. 2011). U normolipidemických pacientů s nálezem xantomů Achillovy šlachy byla popsána porucha reverzního transportu cholesterolu spojená s poklesem subfrakce HDL₃ (Matsuura et al. 2005). Inkubace částic LDL s tkání z xantomů zvyšuje obsah MDA v LDL až 15-krát, na rozdíl od inkubace LDL s kontrolní tkání, při níž došlo ke vzestupu MDA pouze 2-krát. Současně se zvýšila elektroforetická pohyblivost modifikovaných LDL (Hirata et al. 2002). Bylo prokázáno, že k oxidativní modifikaci nativních LDL došlo také po fagocytóze agregovaných LDL v lysosomech makrofágů. Oxidační modifikaci urychlovala přítomnost ferritinu a zpomalovalo zvýšení lysosomálního pH a některé v tučích rozpustné antioxidanty (probucol, butylovaný hydroxytoluen) (Wen a Leake 2007). Inhibitory protonové pumpy inhibicí lysosomální H/K dependentní ATPasy a změnou pH by tak mohly zpomalit tvorbu xantomu a snad i ateroklerotických lézí (Namazi a Sharifian 2008).

Nositelé šlachových xantomů ve skupině osob s molekulárně-geneticky diagnostikovanou FH na podkladě mutací *LDLR* měli ve srovnání s pacientů s FH, ale bez šlachových xantomů vyšší plasmatické koncentrace TNF- α , IL-6, IL-8 i aktivity plazmatické tryptázy. Inkubace makrofágů osob s FH a TX vyvolala vyšší zánětlivou reakci ve srovnání s inkubací makrofágů osob s FH bez TX na stimulaci ox-LDL. Předpokládá se, že na vzniku šlachových xantomů se podílí vyšší stupeň zánětu (geneticky podmíněný). Uvolněná tryptáza pochází z žírných buněk (vykazuje 44 % homologii se serinovou proteázou) a je schopna degradovat HDL₃, které se podílejí na reverzním transportu cholesterolu (Artieda et al. 2005).

Výskyt

Přesné epidemiologické údaje o výskytu rozličných typů xantomů chybějí a nezmiňují je ani klasické lipidologické monografie (Šobra 1980, Thompson 1990, Durlington a Sniderman 2000).

Ze všech xantomatózních infiltrací naprostou většinu (> 95 %) tvoří *xantelasma palpebrarum* (XP) (Bergman 1998). Starší práce uvádějí prevalenci XP mezi 0,3 – 1,1 %; přičemž ženy měly téměř dvojnásobnou frekvenci nálezu XP oproti mužům. Převažovalo postižení osob starších 50 let (Ghosh et al. 2009, Kim et al. 2012). Novější práce udávají prevalenci XP v běžné populaci 4,4 % s rovnoměrným postižením mužů i žen (Christoffersen et al. 2011). Podobná data byla získána i při analýze pacientů lipidové poradny (Zeman et al. 1981). U nemocných s hyperlipoproteinémií IV. typu (izolovaná hypertriglyceridémie) popsal výskyt XP v 10 % (Šobra 1980). Udává se, že přechodně se mohou vyskytnout XP v 1. trimestru gravidity a po porodu u části žen vymizí (Durlington a Sniderman 2000).

Šlachové xantomy (TX) se zjišťují u pacientů s FH, diagnostikovanou na podkladě mutací v *LDLR* v průměru u 30 % postižených jedinců, přičemž jejich prevalence se zvyšuje ze 7 % (ve 3. dekádě) do 40 % (v 6. dekádě) (Civeira et al. 2005). Podobné údaje (20 - 50 %) udávají i další autoři při klinickém vyšetření pacientů s FH, přičemž abnormální texturu Achillovy šlachy a její zesílení (i bez klinicky zjevného klinického průkazu xantomu Achillovy šlachy) prokázali až u 68 % osob s FH (Junyent et al. 2005).

Eruptivní xantomy (XE) jsou patognomonickým kožním projevem těžké HTG. Těžká HTG (koncentrace TG > 11,2 mmol/l) má odhadovanou prevalenci 18 případů/ 100 tis. obyvatel (Leaf 2008). U pacientů s těžkou HTG byla retrospektivně zjištěna prevalence eruptivních xantomů 10 % (Sandhu et al. 2011). Podle starších monografií se eruptivní xantomy prokazují až u 60 % pacientů s familiární chylomikronémií (Šobra 1980), avšak prevalence tohoto onemocnění se udává v počtu 1 případ na 10⁶/porodů.

Xanthoma striatum palmare byla popsána u 3 % nemocných s těžkou HTG (Sandhu et al. 2011). Data týkající se prevalence tuberózních xantomů i dalších forem xantomů v odborné literatuře chybějí.

Klinický obraz

Následovně bude popsán klinický obraz nejčastějších a klinicky nejvýznamnějších a nejzávažnějších (jak z hlediska diagnostiky tak prognózy) forem xantomů. Při klinické rozdělení xantomů se přidržíme rozdělení podle referenční monografie kožního lékařství (Štokr 2008).

Xanthoma eruptivum. Eruptivní xantomy jsou charakterizovány rychlým výsevem [zpravidla do 3 týdnů od rozvoje těžké HTG (TG > 11,2 mmol/l)] žlutavých makulopapulózniích eflorescencí o průměru 1 - 4 mm, které mohou mít erytematózní lem („hallo“). Predilekční oblastí eruptivních xantomů jsou hýždě, záda (bederní krajina) a oblasti nad extenzory dolních končetin. Eruptivní xantomy spolu s těžkou HTG jsou součástí chylomikronemického syndromu. Nález EP signalizuje přítomnost těžké HTG, dále možnost nově zjištěného nebo dekompenzovaného diabetes mellitus i riziko akutní pankreatitidy.

Chylomikronemický syndrom je definován jako těžká HTG („hypertriglyceridemická krize“) a přítomnost alespoň jednoho z dalších nálezů [eruptivní xantomy, lipemia retinalis, bolesti (nebo dyskomfort) břicha, akutní pankreatitida, hepato-splenomegalie] (Richter 1992, Leaf 2008, Sandhu et al. 2011).

Xanthoma tuberosum. Tuberózní xantomy jsou žlutavé papulo-nodulární útvary (uložené v korigu a podkoží) velikosti od 3 mm do několika cm. Bývají lokalizovány převážně na hýždích a extenzorových plochách končetin (lokty, kolena, ruce a nožní klouby). Tuberózní xantomy jsou patognomonickým příznakem „*autozomálně dominantní hypercholesterolemie*“, pojem jež zahrnuje klasickou familiární hypercholesterolemii (FH) s mutacemi v genu LDL-receptoru (*LDLR*), dále familiární defekt apolipoproteinu (apo) B-100 (FDB) na podkladě mutace *apoB* a non-FH/non-FDB hypercholesterolemie (FH3). Tuberózní xantomy se vyskytují dále u familiární dys- β -lipoproteinémie, (β -)sitosterolemie (s mutacemi v *ABCG5/ABCG8*) a cerebrotendinózní xantomatózy (CTX) na podkladě mutace sterolové 27-hydroxylázy (*CYP27*). Vzácně bývají přítomny u sekundárních DLP (nefrotický syndrom, hypotyreóza) (Singh a Simalti 2009, Moroney a Besse 2012, Kalidaz a Behrouz 2008, Clayton 2011).

Xanthoma tendineum. Šlachové xantomy (XT) difúzně infiltrují šlachy, ligamenta (úpony šlachové) a fascie. Jsou uloženy subkutánně a jsou kryty normální kůží. Predilekční lokalizaci představuje Achillova šlacha a šlachy extenzorů prstů rukou, kolena a loktů. Často jsou uloženy subperiostálně v oblasti tuberostatis tibiae (úpon patelární šlachy). Tvar šlachových xantomů je nodulární či fusiformní; nad klouby mohou být tuhé konzistence. Pokud se diagnostikují v oblasti Achillovy šlachy před rozvojem hrbolu, lze zjistit šlachové

ztluštění, které je možné kvantifikovat zobrazovacími metodami (USG, CT, NMR, viz níže). Nález XT je příznačný pro dyslipidémie uvedené u tuberózních xantomů s výjimkou familiární dys- β -lipoproteinémie (hyperlipoproteinémie III. typu).

Xanthoma diffusum planum. Ploché difúzní xantomy žluto-oranžové barvy jsou vzácným tvarem xantomů. Bývají lokalizovány v axilách, na krku, ramenou a hýždích. Zpravidla nebývají spojeny s dyslipidemií. Jejich nález nutí pomýšlet na přítomnost monoklonální gamapatie (mnohočetný myelom, MGUS) či na přítomnost nádorového lymfoproliferativního onemocnění (NHL, CLL, CML) (Spanou a Borradori 2010).

Xanthoma intertriginosum. Jedná se žlutavá ložiska infiltrující intertriginózní prostory (axilly, meziprstí, ohyby loktů a kolen). Byly popsány u FH na podkladě mutace *LDLR*.

Xanthoma striatum palmare. Jedná se o ploché žlutooranžové xantomy ve flekčních liniích ruky (*xanthoma striatum palmare*) případně pouze o žlutavé zbarvení flekčních rýh (*xantochromia striatum palmaris*). Nález těchto xantomů je patognomonickým pro primární dys- β -lipoproteinémii (*synonymum* broad- β -disease, či hyperlipoproteinémie III. typu). Někdy se vyskytují u nově diagnostikovaného DM, hypotyreózy, či primární biliární cirhózy (resp. u chronického cholestatického syndromu) (Nagarajan et al. 2003). U chronické cholestázy je patrné *xanthoma striatum palmare*, xantomy na krku a mnohočetná xantelasmata. Tyto eflorescence mizí po obnovení průchodnosti žlučových cest či s rozvojem jaterní nedostatečnosti (Žák a Zeman 2009).

Xanthelasma palpebrarum. Jedná se ploché bělavé až nažloutlé xantomy lokalizované na horním (v 70 %) i dolním víčku, vzácně pak tvořící cirkulární formace. U dětí a adolescentů xantelasmata mohou být spolu s *arcus lipoides cornea*, tuberózními a šlachovými xantomy projevem autozomálně dominantní hypercholesterolemie. Ve většině případů se zjišťují u jedinců starších 50 let a z nich zhruba u poloviny je diagnostikována dyslipidémie. Rozhodně by nález *xanthelasma palpebrarum* (XP) neměl být bagatelizován (viz výše). Nositelé XP mají, na rozdíl od *arcus lipoides cornea*, zvýšené riziko ICHS, IM i ICHDK a podle některých studií také kratší délku života (Menotti et al. 2013, Christoffersen et al. 2011).

Xanthoma disseminatum. Jedná se o benigní, vzácnou histiocytózu. Postihuje převážně muže a manifestuje se u adolescentů. V obličeji (periorbitálně, perorálně) a v intertriginózních prostorách se objevují oranžovo-žluto-hnědé papulo-nodulární eflorescence. Někdy postihují vnitřní orgány (dýchací cesty, ústní dutina, hypofýzu a CNS) (Török 1998).

Xanthogranuloma necrobioticum. Nekrobiotický xantogranulom (NXG) vytváří mnohočetné oranžovo-žluté, hnědo-červené či modro-fialové papulo-nodulární útvary s predilekční lokalizací periorbitálně, ale i jinde, symetricky na hlavě, krku a trupu. Bývá spojen s normolipidemií i sekundární hyperlipidemií provázející monoklonální gamapatií (Török 1998, Jeziorska et al. 2003).

Diagnóza a diferenciální diagnóza

Diagnóza xantomů je většinou snadná a opírá se morfologický obraz a v nejasných případech o histologické vyšetření. Přítomnost xantomů asociovaných s DLP (*xantelasma*, šlachové a tuberózní xantomy) a předčasnou aterosklerózou vyžaduje pečlivou anamnézu i vyšetření. Osobní i rodinná anamnéza zjišťuje přítomnost a věk manifestace klinických projevů kardiovaskulárních (ICHS, COM, ICHDK) a hromadných metabolických onemocnění (DM, DLP) u probanda i jeho rodinných příslušníků 1. stupně. Přítomnost XP by měla být indikací k neinvazivnímu vyšetření cév (USG magistrálních tepen hlavy a krku, IMT karotid, tibio-brachiální index) i USG vyšetření jater (k potvrzení/vyloučení NAFLD).

Raritní sitosterolemie se manifestuje v dětství. Klinický obraz zahrnuje šlachové a tuberózní xantomy, předčasnou ICHS a jiné projevy aterosklerózy, ataky hemolýzy, atalgie a artritidu (Cheng et al. 2003). Cerebrotendinózní xantogranulomatóza (CTX) je velmi vzácná

autozomálně recesivně přenášené onemocnění. Jeho frekvence činí 1 případ na $5 \cdot 10^4$ /porodů. Je podmíněna defektem sterolové 27-sterolové hydroxylázy. V kojeneckém věku a raném dětském věku se projevuje cholestázou, kataraktou a průjmy. U dospělých se přidávají paraparézy, ataxie, dysartrie a pokles kognitivních funkcí a demence. Laboratorní diagnostika se opírá o zhruba 6-krát vyšší koncentrace plasmatického cholestanolu a zvýšený odpad žlučových alkoholů do moči. Vyšetření může být doplněna genetickým vyšetřením *CYP27* (Kalidaz a Behrouz 2008, Clayton 2011).

Nález plochého difúzního xantomu či nekrobiotického xantogranulomu vyžaduje doplnit klinická, laboratorní i zobrazovací vyšetření laboratorním vyšetřením zaměřeným na přítomnost monoklonální gamapatie (mnohočetný myelom, MGUS) nebo nádorového lymfoproliferativního onemocnění (FACS, histologické vyšetření lymfatických uzlin, PET/CT).

Při podezření na FH by klinická a laboratorní vyšetření měla být doplněna zobrazovacími metodami cílenými na Achillovu šlachu (USG, CT nebo NMR). Suverénní metodou je USG vyšetření, které se provádí 2 cm nad inzerci Achillovy šlachy k patní kosti. Vyšetřuje se příčný i sagitální rozměr Achillovy šlachy i její textura. Pro FH je charakteristické zesílení tloušťky Achillovy šlachy (jsou tabelovány prahové hodnoty pro věk a pohlaví), ztráta pravidelné fibrilární textury a přítomnost jednoduchých či mnohočetných echolucentních okrsků. Zesílení a změna textury Achillovy šlachy je výlučným nálezem u autozomálně dominantní hypercholesterolemie a může být diferenciativně diagnostickou metodou k odlišení FH od jiných primárních dyslipidemií (polygenitní hypercholesterolemie, familiární kombinovaná dyslipidemie) (Junyent et al. 2005, Tsouli et al. 2009).

Vždy by mělo být provedeno interní a lipidologické vyšetření. V indikovaných případech je nutné doplnit další specializovaná vyšetření, kardiologické, angiologické, neurologické, oční, imunologické a revmatologické.

Z laboratorních testů je vždy indikován lipidogram [celkový cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), triglyceridy (TG), LDL-cholesterol (LDL-C), apolipoprotein B (apoB), apoA-I], koagulační parametry (fibrinogen, D-Dimery, APTT, INR), krevní obraz, glykémie, glykovaný hemoglobin, mikroalbuminurie, reaktanty akutní fáze zánětu (hs-CRP), funkční jaterní testy (bilirubin, ALT, AST, GMP, ALP), urea, kreatinin, kyselina močová. Podezření na FH a FDP a primární dys- β -lipoproteinemii optimálně doplňuje molekulárně genetické vyšetření mutací *LDLR*, *apoB* i vyšetření isoforem *apoE*. Při podezření na sitosterolemii je indikována kvantitativní vyšetření fytosterolů plynovou chromatografií (CG) a molekulárně genetické vyšetření *ABCG5/ABCG8* transportérů (Alam et al. 2000, Cheng et al. 2003). Analýza pomocí plynové chromatografie, případně plynovou chromatografií s hmotovou spektroskopií prokazuje až 10 až 60-krát vyšší koncentrace β -sitosterolu, až 3 až 6-krát vyšší koncentrace kampesterolu a stigmasterolu (Cheng et al. 2003).

V diferenciativní diagnóze je nutné postupovat v podle typu xantomu. U papilózních eflorescencí se zvažují syringomy, milia, histiocytóza a dnové tofy. U šlachových xantomů degenerativní tendopatie, nádory a revmatoidní uzle. Dále je nutné odlišit širokou škálu pseudoxantomů (papilózních dermadromů charakteru žlutavých papulek a splývajících v plochá infiltrovaná ložiska). Do skupiny pseudoxantomů se řadí *pseudoxanthoma elasticum*, *amyloidní elastóza*, *naevus sebaceus*, *tumor sebaceus*, *juvenilní xantogranulom*; někteří autoři do této skupiny začleňují *xanthogranuloma necrobioticum*. Popis těchto eflorescencí přesahuje zaměření kapitoly a pro podrobnější informaci odkazujeme na monografii dermatologie (Török 1998, Štok 2008).

Prevence a léčba

Léčba se řídí obecnými zásadami léčby základního onemocnění a její popis přesahuje rámec kapitoly. V případě zjištěné DLP je indikovaná hypolipidemická léčba, která v řadě případů vede nejen k dosažení cílových koncentrací aterogenních lipidů a lipoproteinů (TC, LDL-C, TG, apoB, HDL-C), ale i k regresi xantomů. Byla popsána regrese eruptivních, palmárních a tuberózních xantomů. Rovněž u šlachových xantomů, pokud je přítomno pouze zesílení tloušťky Achillovy šlachy dochází k zhruba po 12 měsících léčby k výrazné regresi xantomů (Török 1998, Park et al. 2005, Renner et al. 2008, Tsouli et al. 2009). Léčba CTX se opírá o podávání kyseliny chenodesoxycholové a statinů (Kalidaz a Behrouz 2008). Léčba sitosterolemie vychází z omezení fytoosterolů v potravě, podávání sekvestrantů žlučových kyselin (colestid, cholestyramin) případně inhibitorů absorpce cholesterolu (ezetimib).

Léčba XP, pokud je spojeno s dyslipidemií, se řídí výše uvedenými zásadami. Jinak se používá chirurgická excize, laserová ablace či chemická kauterizace pomocí kyseliny trichloroctové (Cannon et al. 2010).

Závěrem nutné zdůraznit, že přítomnost xantomů nemá pouze kosmetický význam, ale je příznakem, který je asociován s průměrnou délkou života, v některých případech může signalizovat závažnou metabolickou poruchu a ohrožení zdraví i života. Přítomnost XP v běžné populaci a šlachových xantomů u FH na podkladě mutace *LDLR* pak nositeli významně zvyšuje riziko KVO. Normolipidemické plošné xantomy pak upozorňují na možnost asociace xantomatózních infiltrací s MG či nádorovým lymfoproliferativním onemocněním.

Poděkování

Studie byla podporována výzkumnými projekty: (1) RVO-VFN 641265/2012 Ministerstva zdravotnictví České republiky; (2) PRVOUK-P25/LF1/2 Karlovy Univerzity v Praze.

Literatura

- ALAM M., GARZON MC., SALEN G., et al. Tuberous xanthomas in sitosterolemia. *Pediatr Dermatol* 2000; 17: 447-449.
- ARTIEDA M., CENARRO A., JUNGUERA C., et al. Tendon xanthomas in familial hypercholesterolemia are associated with differential inflammatory response of macrophages to oxidized LDL. *FEBS Lett* 2005; 579: 4503-4512.
- BERGMAN R. Xanthelasma palpebrarum and risk of atherosclerosis. *Int J Dermatol* 1998; 37: 343-349.
- BREWER HB. High-Density lipoprotein Metabolism. In: Ballantyne Clinical Lipidology. A Companion to Braunwald's Heart Disease. Philadelphia: Saunders Elsevier 2009, 45-55.
- CANNON PS., AJIT R., LEATHERBARROW B. Efficacy of trichloroacetic acid (95 %) in the management of xanthelasma palpebrarum. *Clin Exp Dermatol* 2010; 35: 845-848.
- CIVEIRA F., CASTILLO S., ALFONSO E., et al. Tendon xanthomas in familial hypercholesterolemia are associated with cardiovascular risk independently of the low-density lipoprotein receptor gene mutation. *Arterioscl Tromb Vasc Biol* 2005; 25: 1960-1965.
- CLAYTON PT. Disorders of bile acid synthesis. *J Inherit Dis* 2011; 34: 593-604.
- DURINGTON P., SNIDERMAN A. Hyperlipidaemia. Oxford: Health Press 2000.
- GHOSH YK., PRADHAM E., AHLUWALIA S. Excision of xanthelasmata – clamp, shave, and suture. *Int J Dermatol* 2009; 48: 181-183.
- HIRATA Y., OKAWA K., IKEDA M., et al. Low density lipoprotein oxidized in xanthoma tissue induces the formation and infiltration of foam cells. *J Dermatol Sci* 2002; 30: 248-255.
- CHENG WF., YUEN YP., CHOW CB., et al. Sitosterolaemia and xanthomatosis in a child. *Hong Kong Med J* 2003; 9: 206-209.

- CHRISTOFFERSEN M., FRIKKE-SCHMIDT R., SCHNOUT P., et al. Xanthelasmata, arcus lipoides cornea, and ischaemic vascular disease and death in general population: prospective cohort study. *BMJ* 2011; 343: d5497 doi:10.1136/bmj.d5497.
- JEZIORSKA M., HASSAN A., MACKNESS MI., et al. Clinical, biochemical, and immunohistochemical features of necrobiotic xanthogranulomatosis. *J Clin Pathol* 2003; 56: 64-68.
- JUNYENT M., GILABERT R., ZAMBÓN D., et al. The use of Achilles tendon sonography to distinguish familial hypercholesterolemia from other genetic dyslipidemias. *Arterioscl Tromb Vasc Biol* 2005; 25: 2203-2208.
- KALIDAS K., BEHROUZ R. Inherited metabolic disorders and cerebral infarctions. *Exp Rev Neurother* 2008; 8: 1731-1741.
- KIM J., KIM YJ., LIM H., LEE SI. Bilateral circular xanthelasma palpebrarum. *Arch Plast Surg* 2012; 39: 435-437.
- KOUMAR V., ABBAS AK., FAUSTO N., ASTER JC. Cellular response to stress and toxic insult: adaptation, injury, and death. In: *Pathologic basis of disease*. 8. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier 2010, 3-42.
- LEAF DA. Chylomicronemia and chylomicronemia syndrome: a practical approach to management. *Am J Med* 2008; 121: 10-12.
- MATSUURA F., HIRANO K., KOSEKI M., et al. Familial massive tendon xanthomatosis with decreased high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux. *Metabolism* 2005; 54: 1095-1101.
- MENOTTI A., PUDDU PE., LANTI M., et al. Cardiovascular risk factors predict survival in middle-aged men during 50 years. *Eur J Intern Med* 2013; 24: 67-74.
- MILLER YI., TSIMIKAS S. Lipoprotein oxidation and modification. High-Density lipoprotein Metabolism. In: *Ballantyne Clinical Lipidology. A Companion to Braunwald's Heart Disease*. Philadelphia: Saunders Elsevier 2009, 93-110.
- MORONEY PJ., BESSE J-L. Resection of bilateral massive Achilles tendon xanthomata with reconstruction using a flexor hallucis pontis Pontus tendon transfer and Bosworth turndown flap: a case report and literature review. *Foot Ankle Surg* 2012; 18: e25-e28.
- NAGARAJAN DV., BOREHAM PA., PARTITY VJ. Palmar striated xanthomas. *Postgrad Med J* 2003; 79: 690.
- NAMAZI MR., SHARIFIAN M. The potential anti-xanthoma and anti-atherosclerotic effects of proton pump inhibitors. *J Clin Pharm Ther* 2008; 33: 579-580.
- OOSTERVEER DM., VERMISSEN J., YAZDANPANA M., HAMZA TH. Differences in characteristic and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients with and without tendon xanthomas: a systematic review and metaanalysis. *Atherosclerosis* 2009; 207: 311-317.
- PANDHI D., GUPTA P., SINGAL A., et al. Xanthelasma palpebrarum: a marker of premature atherosclerosis (risk of atherosclerosis in xanthelasma). *Postgrad Med J* 2012; 88: 198-204.
- PARK JR., JUNG TS., JUNG JH., et al. A case of hypothyroidism and type 2 diabetes associated with type V hyperlipoproteinemia and eruptive xanthomas. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 502-505.
- RENNER R., TEUWEN I., HARTH W., et al. Eruptive xanthomas with hypertriglyceridemia. *Hautartz* 2008; 55: 995-999.
- RICHTER WO. Chylomicronemia and Chylomicronemia syndrome. In: *Treatment of Severe Dyslipoproteinemia in the Prevention of Coronary Heart Disease 3*, AM. Gotto, M. Mancini, WO. Richter, P. Schwandt (editors). Basel: Karger 1992, 165-173.

- SANDHU S., AL-SARRAF A., TARABOANTA C., et al. Incidence of pancreatitis, secondary cause, and treatment of patients referred to special lipid clinic with severe hypertriglyceridemia: a retrospective cohort study. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 157.
- SINGH RK., SIMALTI AK. Tuberos xanthomas. *Indian Pediatr* 2009; 46: 727.
- SPANOU Z., BORRADORI L. Difuse plane xanthomas, a cutaneous marker for monoclonal gammopathies and lymphoproliferative disease. *Eur J Haematol* 2011; 86: 91.
- SZALAT R., ARNULF B., KARLIN L., et al. Pathogenesis and treatment of xanthomatosis associated with monoclonal gammopathy. *Blood* 2011; 118: 3777-3784.
- ŠOBRA J. Vrozené poruchy metabolismu lipoproteinů. In: J. Hyánek *Klinické a biochemické aspekty vrozených metabolických vad*. Praha: Avicenum 1980, 200-240.
- ŠTORK J. Kožní projevy z poruch metabolismu a nutrice. In: J. Štork et al. *Dermatologie*. Praha: Galén, Karolinum 2008, 259-274.
- THOMPSON GR. *A handbook of hyperlipidemia*. London: MSD, Merk Sharp &Dohme, Current Science Ltd. 1990.
- TÖRÖK L. *Kožní projevy při chorobách vnitřních orgánů*. Heidelberg – Leipzig: J.A. Barth Verlag, Hütig GmbH 1998.
- TOTH PP. High-density Lipoprotein. In: PP. Toth, KC Maki Eds. *Therapeutic Lipidology*. Totowa, New Jersey: M.H.Davidson, Human Press 2007, 159-199.
- TSOULI SG., KIORTSIS DN., ARGYROPOULOU MI., et al. Pathogenesis, detection and treatment of Achilles tendon xanthomas. *Eu. J Clin Invest* 2005; 35: 236-244.
- TSOULI SG., XYDIS V., ARGYROPOULOU MI., et al. Regression of Achilles' tendon thickness after statin treatment in patients with familial hypercholesterolemia: An ultrasonographic study. *Atherosclerosis* 2009; 205: 151-155.
- WEN Y., LEAKE DS. Low density lipoprotein undergoes oxidation within lysosomes in cells. *Circ Res* 2007; 100: 1337-1343.
- ZEMAN M., ŽÁK A., HERDOVÁ J. Analýza plazmatických lipidů a klinická charakteristika pacientů s nálezem xanthelasma palpebrarum. *Čas Lék čes* 1981; 120: 806-808.
- ŽÁK A., ZEMAN M. Sekundární dyslipidémie (dyslipoproteinémie). In: Š. Svačina a kol. *Poruchy metabolismu a výživy*. Praha: Galén 2010, 271-288.

Zkratky

- ABCBG5/G8* - geny kódující ATP dependentní kazetové transportéry ABG5/G8
- apo - apolipoprotein
- ABCA1 - ATP dependentní cholesterolový transportér typ A1
- ABCG1 - ATP dependentní cholesterolový transportér typ G1
- ABCG4 - ATP dependentní cholesterolový transportér typ G4
- APOB* - gen apolipoproteinu B
- CETP - transferový protein pro estery cholesterolu
- CLL - chronická lymfatická leukémie
- CML - chronická myeloidní leukémie
- COM - cévní onemocnění mozku
- CTX - cerebrotendinózní xantomatóza
- CYP27A* - gen sterolové 27 hydroxylázy
- DM - diabetes mellitus
- DLP - dyslipidémie
- FDB - familiární defekt apo B
- FH - familiární hypercholesterolemie
- HDL - lipoprotein o vysoké hustotě
- HTG - hypertriglyceridémie
- HX - hyperlipidemický xantom

IDL	- lipoprotein o intermediární hustotě
ICHDK	- ischemické (uzávěrová) choroba dolních končetin
ICHS	- ischemické choroba srdeční
IL	- interleukin
IM	- infarkt myokardu
KVO	- kardiovaskulární onemocnění
LCAT	- lecitin: cholesterol acyltransferáza
LDL	- lipoprotein o nízké hustotě
LDL-C	- cholesterol transportovaný v LDL
LDL-R	- LDL-receptor (apo B/E receptor)
<i>LDLR</i>	- gen apolipoproteinu LDL-receptoru
LP	- lipoprotein
LRP	- low density lipoprotein related receptor (VLDL-receptor)
MCP-1	- monocyte chemotacting protein-1
M-CSF	- kolonie monocyty stimulující faktor
MDA	- malondialdehyd
MDS	- myelodysplastický syndrom
MG	- monoklonální gamapatie
MGUS	- monoklonální gamapatie nejasného určení
MM	- mnohočetný myelom
mm-LDL	- minimálně modifikované LDL
NAFLD	- nealkoholická steatóza jaterní
NHL	- non-hodgkinský lymfom
TNF- α	- tumor nekrotizující faktor- α
NX	- normolipidemické xantom
NXG	- nekrobiotický xantogranulom
ox-LDL	- oxidativně modifikované LDL
<i>PCSK9</i>	- gen pro <i>proprotein convertase subtilisin/kexin 9</i> kódující neurální apoptózou regulovanou konvertázu 2 (<i>NARC-1</i>), která zvyšuje degradaci LDL-receptorů.
RCT	- reverzní transport cholesterolu
SR	- scavenger („zametací“) receptor
SR B-1	- SR typ B1
VLDL	- lipoprotein o velmi nízké hustotě
XE	- xanthoma eruptivum
XP	- xanthelasma palpebrarum
XSP	- xanthoma striatum palmare
XT	- xanthoma tendineum

Tabulka 1. Výskyt xantomů u různých typů dyslipidemií

Nosologická jednotka	Molekulární defekt	Dědičnost	Prevalence	Typ xantomu
FH	<i>LDLR</i>	AD	1:500 (ht); 1:10 ⁶ (hm)	xanthoma tendineum, xanthoma tuberosum xanthelasma/ arcus lipoides cornea ¹
FDB	<i>APOB</i>	AD	1:800 (ht); 1:4 x10 ⁶ (hm)	
FH3	<i>PCSK9</i> ¹	AD	1:25x10 ³ (ht)	
β-sitosterolémie	<i>ABCG5/ABCG8</i>	AR	1:5x10 ⁶	xanthoma tendineum
CTX	<i>CYP27A</i>	AR	1: 5x10 ⁴	xanthoma tuberosum
HLP III. typu ³	<i>E2/E2</i>	AR	1: 5x10 ³	xanthoma striatum palmare eruptivní (tuberoeruptivní) xantomy ²
Familiární hyperchylomikronémie	<i>LPL</i> <i>APOC-II</i>	AR AR	1: 10 ⁶	xanthoma eruptivum
Familiární HTG	?	AD	vzácná	xanthelasma palpebrarum
Těžká HTG ⁴	?	AD	18: 10 ⁵	xanthoma eruptivum
PHC ⁵	?	Polygenní	1 : 100 - 150	xanthelasma palpebrarum
FKH ⁶	?	AD, polygenní	1: 100	arcus lipoides cornea

Zkratky: FH – familiární hypercholesterolémie; FDB – familiární defekt apolipoproteinu B-100; FH3 – non-FH/non-FDB hypercholesterolémie;

HLP III. typu – hyperlipoproteinémie III. typu (primární, neboli familiární dys-β-lipoproteinémie); CTX – cerebrotendinózní xantomatóza;

těžká HTG – těžká hypertriglyceridémie; PHC – polygenní hypercholesterolémie; *LDLR* – gen LDL-receptoru; *APOB* – gen apolipoproteinu B-100; *PCSK9* – gen pro proprotein convertase subtilisin/kexin 9; *LPL* – gen pro lipoproteinovou lipasu; *APOC-II* – gen pro apolipoprotein C-II; AD – autozomálně dominantní; AR autozomálně recesivní; hm – homozygot (-ní); ht – heterozygot (-ní); DLP – dyslipoproteinémie; FKH – familiární kombinovaná hyperlipidémie.

Vysvětlivky a poznámky:

^{1/} přítomnost xanthelasma palpebrarum a arcus lipoides cornea je významná pro diagnostiku familiární autozomálně dominantních hypercholesterolémií (FH, FDP, FH3) pouze u jedinců mladších 20 let;

^{2/} při relapsu choroby a zhoršení dyslipidémie;

^{3/} HLP III. typu – vyžaduje kombinaci homozygotie *apoE2/E2* (s autozomálně recesivní dědičností) a dalšího přidatného hyperlipidemizujícího faktoru (familiární DLP) či přítomnost sekundární DLP (dekompensovaný DM, hypotyreóza, obezita, přísun alkoholu, farmakologické dávky estrogenů).

^{4/} vznik těžké HTG (HLP V. typu podmíněná vzestupem VLDL a přítomností chylomikronů)

^{5/} PHC vzniká kombinací vlivů zevního prostředí a genetických faktorů (mutací a polymorfismů *apoE4*, *CETP*, *jabatní lipáza*, *LPL*, *PCSK9*, *ABCG5/G8*, *LCAT*, *CYP7A1*);

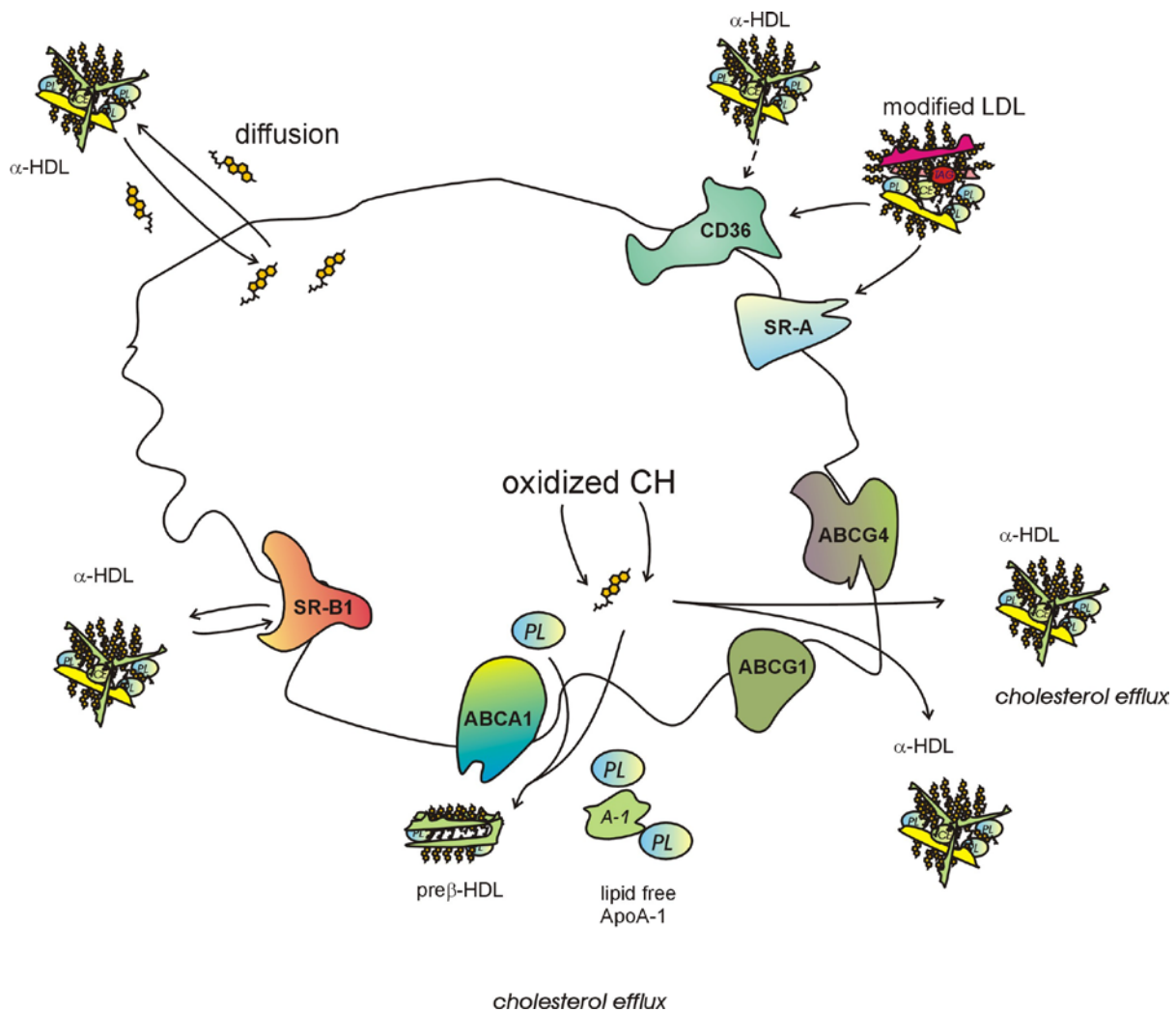
^{6/} FKH předpokládá se spoluúčast polymorfismů *apoB-100*, *LPL*, *apoE*, clusteru *apoC-III/apoA-I/apoA-IV*, dále defekt nebo polymorfismy *apoC-II* a receptoru pro acylaci stimulující protein v tukové tkáni (acylation stimulating protein, *ASP*).

^{7/} FH3 – u části nemocných se prokazují mutace v genu pro *PCSK9*, který kóduje neurální apoptózu regulovanou konvertázou 2 (*NARC-1*) zvyšující degradaci LDL-receptorů. Mutace spojené se zvýšenou expresí *PCSK9* (gain of function) jsou spojeny s hypercholesterolémií.

Tabulka 2. Asociace xantomů a chorobných jednotek, resp. syndromů

Typ xantomu	Chorobná jednotka/syndrom
Xanthoma tendineum	Autozomálně dominantní hypercholesterolémie (FH, FDB, nonFH/nonFDB hypercholesterolémie) β-sitosterolémie Cerebrotendinózní xantomatóza
Xanthoma tuberosum	Autozomálně dominantní hypercholesterolémie β-sitosterolémie Cerebrotendinózní xantomatóza Primární dys-β-lipoproteinémie
Xanthoma eruptivum	Těžká hypertriglyceridémie (chylomikronemický syndrom)
Xanthoma striatum palmare	Primární dys-β-lipoproteinémie; Sekundární dyslipidémie u cholestatického syndromu
Xanthelasma palpebrarum	Autozomálně dominantní hypercholesterolémie (patognomonickým nález pouze u jedinců < 20 let) Dyslipidémie různé etiologie (polygenní hypercholesterolémie, familiární HTG, familiární kombinovaná hyperlipidémie)
Xanthoma diffusum planum	vyskytuje se u monoklonální gamapatie (MM, MGUS), NHL, CLL, CML, MDS

Zkratky: HTG – hypertriglyceridémie; MM – mnohočetný myelom; MGUS – monoklonální gamapatie nejasného určení; NHL – non-hodgkinský lymfom; CLL – chronická lymfatická leukémie; CML – chronická myeloidní leukémie; MDS – myelodysplastický syndrom; FH – familiární hypercholesterolémie na podkladě mutace *LDLR*; FDB – familiární defekt apolipoproteínu B na podkladě mutace *APOB*; nonFH/nonFDB hypercholesterolémie na podkladě mutací *PCSK9*

Obrázek 1. Schéma reverzního transportu cholesterolu

Komentář: Zvýšení koncentrace cholesterolu (CH) v makrofágu (Ma) vede k jeho přeměně na pěnovou buňku. Homeostáza a vyrovnaná bilance CH v Ma je zajištěna řadou mechanismů, které usnadňují externalizaci (efflux) CH z buňky na skupinu akceptorů: (i) CH může být externalizován pasivní difusí, kterou určuje koncentrační gradient, na sférické částice HDL₃; (ii); pomocí ABCA1 je CH aktivně transportován spolu s fosfolipidy (PL) na komplexy PL a apoA1 za vzniku diskoidních HDL (dHDL); (iii) CH je aktivně transportován pomocí transportérů ABCG1 a ABCG4 vazbou na HDL₃ za vzniku HDL₂; receptory SR B1 umožňují transfer cholesterolu (pomocí koncentračního gradientu) na povrch sférických částic HDL₂ a HDL₃. Volný (neesterifikovaný) cholesterol je esterifikován za katalýzy LCAT. Částice HDL₂ se zbavují selektivně esterů cholesterolu po vazbě na SR B1 v játrech. Exprese transportérů ABCA1, ABCG1, ABCG4 je regulována koncentrací oxysterolů v buňce. Ty po vazbě na jaterní X receptory (LXR) a heterodimerizaci s receptory kyseliny retinové (RXR) se vážou na specifické vazebné sekvence promotoru genů řídících expresi transportérů.

Obrázek 2. Arcus lipoides cornae a xanthelasma palpebrarum u nemocného s heterozygotní formou familiární hypercholesterolémie na podkladě mutace *LDLR*



Obrázek 3. Xantom Achillovy šlachy u nemocného s heterozygotní formou familiární hypercholesterolémie na podkladě mutace *LDLR*



International Atherosclerosis Society Position Paper Všeobecná doporučení pro léčbu dyslipidemií

SOUHRN

Úvod

International Atherosclerosis Society (IAS) aktualizuje svá doporučení pro léčbu vysokých hladin krevního cholesterolu a dyslipidémie s cílem snížení rizika aterosklerotických kardiovaskulárních chorob (ASCVD). Tento úvodní souhrn zdůrazňuje hlavní závěry celé zprávy. Vlastní zpráva s podrobným rozbohem pokynů následuje. Pokyny obsahují přehled stávajících doporučení založených na důkazech (evidence-based) a spojují je do uceleného souboru doporučení. Tato doporučení jsou určena k doplnění a ucelení informací pro klinickou veřejnost a nemají nahradit klinický úsudek. Zpráva je rozdělena na primární a sekundární prevenci. V sekundární prevenci je při velkém rozsahu dat kladen důraz na randomizované kontrolované klinické studie (RCTs, Randomized Controlled Clinical Trials). V oblasti primární prevence jsou doporučení založena na mnohaletém výzkumu epidemiologickém, genetickém, základním a klinických studiích. Důkazy v primární prevenci jsou omezené, a to nejen z celosvětových RCTs, ale i v počtu randomizovaných a nerandomizovaných studií obecně; ostatní důkazy ke vztahu cholesterolu k ASCVD jsou silné.

Mezi hlavní novinky v těchto doporučeních patří následující:

- Mezinárodní konsensus vychází z velkého počtu důkazů.
- Identifikace non-HDL-cholesterolu (non-HDL-C) jako hlavního nositele aterogenního cholesterolu.
- Definice aterogenního cholesterolu jako LDL-cholesterolu (LDL-C) nebo non-HDL-C.
- Definice optimálních hladin aterogenního cholesterolu (pro LDL-C i non-HDL-C) pro primární a sekundární prevenci.
- Přiřazení větší priority kategoriím dlouhodobého rizika než rizika krátkodobého.
- Nastavení odhadu rizika podle výchozího rizika různých národů či regionů.
- Primární důraz je kladen na intervence v životním stylu; až sekundární důraz na farmakoterapii.

IAS konstatuje, že mnohé země nebo regiony vyvinuly své vlastní pokyny pro léčbu dyslipidémie. Pro ty země a regiony, které mají své vlastní pokyny, je tento dokument IAS k dispozici, aby se mohly rozhodnout, zda své vlastní pokyny modifikovat. Pro ty země a regiony, které v současnosti nemají své vlastní pokyny, je tento dokument IAS k dispozici jako pomůcka pro jejich rozvoj (s pomocí IAS v případě potřeby). Aktuální dokument se v mnoha ohledech podobá jiným pokynům. Jedním z cílů snahy IAS je vyladit harmonizovat stávající pokyny tak, aby byly použitelné na světové úrovni. Jsou uvedena hlediska, která v některých pokynech nemusí být zařazena. Vzhledem k pokroku ve farmakoterapii dyslipidémie, je v řadě pokynů příliš zdůrazněna farmakoterapie na úkor intervencí v životním stylu. Z hlediska IAS je aterosklerotické onemocnění do značné míry chorobou z nezdravých životních návyků - vyjma genetických dyslipidemií. Důležitým cílem doporučení IAS je snaha o dosažení rovnováhy mezi intervencemi v životním stylu a farmakoterapií.

Primární prevence

LDL cholesterol a non-HDL cholesterol jako cíle léčby

Řada důkazních linií poukazuje na lipoprotein o nízké hustotě (LDL) jako na hlavní příčinu ASCVD. Klinicky je jako LDL označován LDL cholesterol (LDL-C). V průběhu uplynulých dvou desetiletí RCT ukázaly, že léčba snižující LDL snižuje riziko ASCVD. Suma nahromaděných důkazů různých typů podporuje tvrzení, že zvýšené hladiny LDL-C jsou hlavním cílem hypolipidemické léčby. Ale narůstá počet důkazů, že lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL) jsou také proaterogenní. Proto je VLDL cholesterol (VLDL-C) dalším potenciálním cílem v léčbě na snížení hladiny cholesterolu. VLDL-C je zvláště zvýšen u osob s hypertriglyceridemií. Součet LDL-C a VLDL-C zahrnuje veškerý cholesterol ve všech aterogenních lipoproteinech a je nazýván non-high density lipoprotein cholesterol (non-HDL-C). Z tohoto důvodu non-HDL-C může být považován v cílech léčby za alternativu k LDL-C. Non-HDL-C přináší lepší odhad aterogenicity u osob se zvýšenou hladinou triglyceridů. Může být přesněji měřen ve vzorcích neodebíraných nalačno, zatímco u LDL-C to není možné. IAS podporuje přijetí non-HDL-C jako hlavní cíle hypolipidemické léčby. Avšak pro ty, kteří upřednostňují použití LDL-C, může být tento zaměňován s non-HDL-C. V následujícím textu může být pod termínem *aterogenní cholesterol* míněn buď LDL-C, nebo non-HDL-C, v závislosti na klinické preferenci. Je třeba poznamenat, že termín celkový cholesterol (TC) se často používá v algoritmech rizika. TC je méně spolehlivý jako cíl léčby, ale může být použit, pokud hodnoty lipoproteinů nejsou k dispozici.

Optimální hladiny LDL-C a non-HDL-C pro primární prevenci

Pokyn IAS definuje optimální hladiny aterogenního cholesterolu v primární prevenci na základě tří linií důkazů: randomizované klinické studie (RCT), populační epidemiologie a genetická epidemiologie. Jako optimální byla pro LDL-C identifikována hladina < 2,6 mmol/l (100 mg/dL). V souladu s tím je odpovídající optimální hladina pro non-HDL-C v primární prevenci < 3,4 mmol/l (130 mg/dL). Tyto hladiny jsou nejdůležitější pro vysoce rizikové populace. Populace s nízkým rizikem mohou tolerovat i poněkud vyšší úrovně, aniž by došlo k závažnějším projevům.

IAS vidí podstatný rozdíl mezi optimálními hladinami aterogenních lipoproteinů a cíli terapie. IAS nepředepisuje specifické „léčebné cíle“ pro aterogenní lipoproteiny za různých okolností. Místo toho identifikuje optimální hladiny aterogenního cholesterolu a sestavuje obecná doporučení, podle nichž by intenzita hypolipidemické léčby snižující hladinu aterogenního cholesterolu měla být adjustována s přihlédnutím k dlouhodobému riziku. Míra této léčby snižující aterogenní cholesterol k optimálním hladinám musí být založena na posouzení klinického stavu.

Identifikace osob, které jsou z dlouhodobého hlediska ohroženy ASCVD

Ačkoli jsou aterogenní lipoproteiny primárně odpovědné za rozvoj aterosklerózy, jiné rizikové faktory urychlují aterogenezi tam, kde lipoproteiny jsou dostatečně vysoké, aby iniciovaly a podporovaly aterosklerózu. Mezi tyto další rizikové faktory patří: kouření cigaret, hypertenze, diabetes, nízké hladiny HDL a pozitivní rodinná anamnéza pro ASCVD. Jako *celkové riziko* označujeme součet těchto rizikových faktorů adjustovaný k věku. Široce přijímané terapeutické strategie vycházejí z předpokladu, že intenzita léčby osob, které jsou ohroženy ASCVD, by měla být stanovena podle absolutního celkového rizika. Toto pravidlo se vztahuje na léčbu aterogenních lipoproteinů, tj. čím vyšší je riziko, tím intenzivnější by měla být terapie snižující cholesterol. Většina předchozích pokynů vycházela z algoritmů pro odhad desetiletého rizika při definování absolutního rizika. Pokyny zahrnující novější rizikové faktory aterosklerózy a metody zobrazovací jsou slibné, ale dosud nebyly šířeji

akceptovány. V posledních letech se důraz přesouvá na celoživotní nebo na dlouhodobé riziko. To je vhodné proto, že kontrola rizika je nutná celoživotně. K dispozici jsou dva nástroje pro hodnocení rizik pro odhad celoživotního (dlouhodobého) rizika kardiovaskulární morbidity: Framinghamské a QRISK. Framinghamské skóre je založeno na čtyřech rizikových faktorech: hypercholesterolemie, hypertenze, kouření a diabetes (viz Full Report s detaily). QRISK je on-line kalkulačka, který zahrnuje standardní rizikové faktory, rodinnou anamnézu ASCVD a index tělesné hmotnosti (BMI). QRISK má tu výhodu, že umožňuje odhady pro různé etnické skupiny, a to přinejmenším ve Velké Británii a pravděpodobně ve většině zemí západní Evropy. Jeho využitelnost pro další národy je nejistá. Hlavní výhodou Framinghamských dat je, že jejich odhady byly porovnávány s rizikem v mnoha různých zemích a regionech, a tak je možné Framinghamské skóre překalibrovat. Proto IAS doporučuje používat v různých zemích Framinghamské skóre jako základní odhad, který je pro jednotlivé země následován re-kalibrací (viz Úplná zpráva o rekalibraci koeficientů - Full Report for recalibration coefficients).

IAS rozlišuje čtyři úrovně rizika pro celkovou pravděpodobnost manifestace ASCVD až do věku 80 let: riziko **vysoké** (> 45 %), **středně vysoké** (30-44 %), **střední** (15-29 %) a **nízké** (< 15%).

Mnoho pokynů považuje familiární hypercholesterolemii, diabetes + jiné rizikové faktory a chronické onemocnění ledvin za ekvivalent vysokého rizika. V závislosti na počtu obyvatel a pohlaví, jde buď o osoby s vysokým rizikem nebo středně vysokým rizikem. Podle toho každá osoba ze zmíněných vyžaduje aktivní intervenci, často se zařazením léků na snížení cholesterolu.

Nastavení intenzity hypolipidemické terapie podle dlouhodobého rizika

Vzhledem k velkému množství okolností ovlivňujících zařazení hypolipidemické terapie, ponechávají tyto pokyny volnost klinickému úsudku a národním doporučením týkajícím se intenzity léčby (nebo konkrétních cílů léčby). Při rozhodování o tom, jak nízko nastavit cílovou hladinu aterogenních lipoproteinů je nutno mít na paměti několik faktorů. Terapie úpravou životního stylu je léčbou první volby, ale v závislosti na míře rizika může být farmakoterapie nezbytná. Tabulka 1 poskytuje obecná doporučení pro nastavení intenzity terapie vzhledem dlouhodobému riziku.

Mnohé osoby s vysokým rizikem potřebují kromě úprav životního stylu i cholesterol - snižující léky (např. statiny). Většina vysoce rizikových osob by měla mít cílovou hladinu LDL cholesterolu na úrovni < 2,6 mmol/L (<100 mg/dL), (nebo non-HDL-C < 3,4 mmol/L; [130 mg/dL]). V mnoha zemích, ale ne ve všech, patří ke kandidátům na farmakoterapii i osoby se středně vysokým rizikem. Podle řady národních doporučení je i v této kategorii žádoucí dosáhnout hladiny LDL-C < 2,6 mmol/L (<100 mg/dL). Z indikace k podání léků snižujících hladinu cholesterolu by neměly být vyloučeny ani ženy ani starší osoby, které spadají do vysokého nebo středně vysokého rizika. Má-li mladší osoba vyšší dlouhodobé riziko způsobené nelipidovými rizikovými faktory (např. kouření a hypertenze), nemusí to nutně znamenat, že primární prevence vyžaduje farmakoterapeutické snižování hladin LDL. U těchto osob by měla být větší pozornost věnována rizikovým faktorům než odhadu rizika - u osob se středním rizikem by změny životního stylu samotné mohly stačit k dosažení přijatelného snížení rizika. Avšak vysoké hladiny LDL a zejména velmi vysoké hladiny LDL, si i na této úrovni rizika zaslouží zvážení indikace farmakoterapie snižující hladinu cholesterolu.

Tabulka 1.

Doporučení IAS pro léčbu snižující hladinu cholesterolu v různých kategoriích rizika

Úroveň rizika do věku 80 let	Nízká (<15%)	Střední (15-24%)	Středně vysoká (25-40%)	Vysoká (> 40%)
Intenzita léčby	-	Střední	Středně vysoká	Vysoká
Specifická léčba	Národní doporučení pro obyvatelstvo	MLŽ ^b + CSL ^c nevyloučena ^d	MLŽ ^b + CSL ^c podle zvážení ^e	MLŽ ^b + CSL ^c indikována ^f

^a Lidé s nízkým rizikem ASCVD by měli být léčeni podle národních doporučení pro obyvatelstvo. Tato doporučení by měla být v souladu s doporučeními IAS léčbu změnou životního stylu.

^b MLŽ = Maximalizace Léčby Životním stylem

^c CSL = Cholesterol Snižující Léky, obvykle statiny

^d Cholesterol snižující farmakoterapie je obvykle vyhrazena pro pacienty s vysokou hladinou aterogenního cholesterolu

^e Léčba statiny je v této kategorii rizika široce doporučována, přestože není přijata v řadě zemích z ekonomických důvodů. Je-li farmakoterapie podávána, měla být dávka dostatečná, aby bylo dosaženo optimálních hladin aterogenního cholesterolu.

^f V této kategorii je farmakoterapie zpravidla indikována. Dávka by měla být dostatečná pro dosažení optimálních hladin aterogenního cholesterolu.

Léčba změnou životního stylu

Hlavním cílem intervence v životním stylu je snížení LDL-C a non-HDL-C. Sekundárním cílem je omezení dalších rizikových faktorů. Zdravý životní styl včetně doporučeného stylu stravování je základním kamenem pro prevenci a léčbu ASCVD. Celkově lze konstatovat, že zdravé způsoby stravování jsou zpravidla kardioprotektivní; přispívají k dosažení nízké hladiny LDL-C a ke zlepšení další klasických i novějších rizikových faktorů.

Panel IAS sestavil následující doporučení pro životní styl v primární prevenci aterosklerotických kardiovaskulárních chorob

LDL-zvyšující lipidy. Omezit příjem nasycených mastných kyselin na < 7 % celkových kalorií, (ale alespoň na < 10 %). Snížit příjem *trans*-mastných kyselin na < 1 % celkových kalorií a snížit příjem dietního cholesterolu na < 200 mg/den.

Ostatní dietetické faktory: Zajistit relativně vysoký příjem ovoce, zeleniny a vlákniny. Nahradit nadbytečné nasycené mastné kyseliny buď polysacharidy bohatými na vlákninu (s důrazem na celozrnné produkty), nebo mono/polynenasycenými mastnými kyselinami. Konzumace dostatku ryb bohatých na n-3 mastné kyseliny. Další kardioprotektivní potraviny zahrnují ořechy, semena a rostlinné oleje. Vhodné jsou potraviny s nízkým obsahem sodíku a vysokým obsahem draslíku. Obsah sodíku v dietě by měl být obecně menší než 2 g denně a < 1500 mg pro osoby se zvýšeným rizikem. Osobám, které konzumují alkohol, je doporučováno nepřekračovat 2 drinky denně pro muže a 1 drink denně pro ženy. Pro další snížení hladiny LDL je nutno zvážit podání potravních doplňků s rostlinnými steroly/stanoly (2 g/den) a rozpustné/viskózní vlákniny (10 až 25 g/den).

Celkový obsah tuku. IAS doporučuje flexibilitu v příjmu celkového množství tuku v závislosti na kulturních preferencích, alternativami je nižší příjem tuku odpovídající 20-25 % celkových kalorií, nebo dokonce ještě nižší (což je typické v Tichomoří zemí lemujících), nebo naopak vyšší příjem tuku 30 až 35 % celkových kalorií, nebo dokonce i

ještě vyšší (jak je typické ve středomořských zemích). Jakékoli celkové zvýšení příjmu tuků než je doporučeno by mělo být ve formě nenasycených mastných kyselin a limity pro nasycené a *trans*-mastné kyseliny by měly být dodrženy. Kromě toho, bez ohledu na celkový obsah tuku ve stravě, musí být splněny nutriční potřeby a energetický příjem by měl být přiměřený pro udržení zdravé tělesné hmotnosti.

Celkový příjem kalorií. Body mass index (BMI), by měl být měřen u všech pacientů. Měl by být kontrolován celkový příjem kalorií, aby byla dosažena a udržena žádoucí hmotnost. Je-li žádoucí hmotnost definována pomocí BMI, měly by být vypracovány národní standardy BMI.

Fyzická aktivita. Je doporučeno provozovat fyzickou aktivitu střední intenzity přibližně 30 minut denně. Tato aktivita by měla být aerobní, na úrovni 40-75 % aerobní kapacity, provozována 5-7 dní v týdnu, po dobu 30-60 minut denně. Osobám, které se snaží zhubnout, se doporučuje, aby zařadily delší/častější časové úseky cvičení (např. 250 - 300 minut týdně nebo > 2000 kcal týdně pohybové aktivity).

Metabolický syndrom. Metabolický syndrom je komplexním rizikovým faktorem pro ASCVD. Obezita a fyzická inaktivita významně přispívají k rozvoji metabolického syndromu. U pacientů s tímto syndromem může být snížení metabolických rizikových faktorů dosaženo redukcí hmotnosti a zvýšením fyzické aktivity. Metabolický syndrom je definován charakteristikami/faktory uvedenými v tabulce 2.

Farmakoterapie

Statiny jsou lékem první volby pro dosažení optimálních hladin aterogenního cholesterolu u osob s vysokým rizikem. U těch, kteří statiny netolerují, jsou k dispozici alternativní postupy: změna druhu statinu, snížení dávky statinu, dávkování statinu obden, nebo výběr alternativních léků (*ezetimib, pryskyřice - sekvestranty žlučových kyselin, niacin - kyselina nikotinová*) – v monoterapii nebo v kombinaci, a současně maximalizace změn životního stylu. Pro dosažení optimálních hladin aterogenního cholesterolu u vysoce rizikových pacientů může být užitečné přidání ezetimibu nebo pryskyřic k léčbě statiny. U pacientů s těžkou hypertriglyceridémií mohou být užity k prevenci akutní pankreatitidy fibráty nebo niacin.

Tabulka 2.

Kritéria pro klinickou diagnózu metabolického syndromu

Kritérium	Hraniční meze
Rozšířený obvod pasu*	definice jsou populačně a geograficky specifické – detaily jsou v Podrobné zprávě
Zvýšená hladina triglyceridů (ekvivalentem je farmakoterapie hypertriglyceridemie)	≥ 1,7 mmol/L (150 mg/dL)
Snížená hladina HDL-C (ekvivalentem je farmakoterapie nízkého HDL-C†)	< 1,0 mmol/L (40 mg/dL) u mužů < 1,3 mmol/L (50 mg/dL) u žen
Zvýšený krevní tlak (ekvivalentem je farmakoterapie léky snižujícími krevní tlak u osoby s anamnézou arteriální hypertenze)	systolický ≥ 130 mm Hg a/nebo diastolický ≥ 85 mm Hg
Zvýšená lačná glykemie‡ (ekvivalentem je farmakoterapie zvýšené glykemie)	≥ 5,5 mmol/L (100 mg/dL)

HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol

*Je doporučeno, aby meze navržené IDF byly používány pro osoby mimo-evropského původu. Pro Evropany pak buď IDF nebo AHA/NHLBI meze, dokud nebude k dispozici více údajů.

†Nejčastěji používané léky při zvýšených hladinách triglyceridů a sníženém HDL-C jsou fibráty a kyselina nikotinová.

‡Většina pacientů s diabetem 2. typu bude mít podle uvedených kritérií metabolický syndrom.

Sekundární prevence

U pacientů s prokázanou ASCVD jsou optimální hladiny LDL-C < 1,8 mmol/L (70 mg/dL), (nebo non-HDL-C < 2,6 mmol/L [100 mg/dL]). Většina pacientů s ASCVD potřebuje maximální dávku statinů, je-li tolerována. Pro dosažení LDL-C < 1,8 mmol/L (70 mg/dL) bude u některých pacientů nezbytné doplnit statiny dalším lékem (tj. ezetimibem a/nebo pryskyřicí). U pacientů, kteří nesnášejí vysoké dávky statinů, je alternativou kombinace střední dávky statinů buď s ezetimibem nebo s pryskyřicí. Pro pacienty s vysokou hladinou triglyceridů jsou výhodnou alternativou léku druhé volby fibráty nebo kyselina nikotinová. Avšak snížení rizika při kombinované farmakoterapii, které by bylo srovnatelné s vysokými dávkami statinů zatím nebylo prokázáno v randomizovaných klinických studiích (RCTs). Analýza podskupin RCT a zobrazovací metody pro aterosklerózu poskytují určité důkazy ve prospěch kombinované farmakoterapie. U pacientů, kteří jsou léčeni maximálními dávkami farmak snižujících cholesterol, by měla léčba životním stylem pokračovat a být zdůrazňována. Změny životního stylu mohou vést k dalšímu snížení rizika. Závěrem je nutno připomenout, že i všechny ostatní rizikové faktory ASCVD musí být vhodně léčeny.